



# Immobilisation d'enzymes dans des hydroxydes doubles lamellaires. Réalisation de biocapteurs pour la détection de polluants organiques

Stéphanie Vial

## ► To cite this version:

Stéphanie Vial. Immobilisation d'enzymes dans des hydroxydes doubles lamellaires. Réalisation de biocapteurs pour la détection de polluants organiques. Matériaux. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2005. Français. NNT : 2005CLF21626 . tel-00685757

**HAL Id: tel-00685757**

**<https://theses.hal.science/tel-00685757>**

Submitted on 5 Apr 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'Ordre : D.U. 1626

# **UNIVERSITE BLAISE PASCAL**

(U.F.R. de Recherche Scientifique et Technique)

## **ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES**

N° : 470

### **THESE**

présentée pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR D'UNIVERSITE**

(Spécialité : Chimie, Sciences des Matériaux)

Par

**Stéphanie Vial**

Diplômée d'Etudes Approfondies

### **Immobilisation d'Enzymes dans des Hydroxydes Doubles Lamellaires. Réalisation de Biocapteurs pour la détection de polluants organiques.**

Soutenue publiquement le 12 décembre 2005, devant la commission d'examen :

Président :	M. J. Livage
Rapporteurs :	M. F. Fievet
	M. B. Bujoli
Examineurs :	Mme. C. Mousty
	Mme. N. Jaffrezic-Renault.
	M. F. Leroux
	M. C. Forano



## **Remerciements**

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire des Matériaux Inorganiques de l'université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II), sous la direction de Monsieur R. Mahiou. Je le remercie de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur C. Forano, Professeur à l'Université Blaise Pascal, qui m'a encadré tout au long de ces années. Son soutien, son enthousiasme et ses conseils avisés, à travers nos discussions, m'ont permis de mener à bien ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à tous les membres du jury,

Monsieur F. Fievet, Professeur à l'Université Denis Diderot, Paris IV, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner et de juger ce travail.

Monsieur B. Bujoli, Directeur de recherche au CNRS à l'UFR des Sciences et Techniques, Nantes, qui m'a fait l'honneur d'accepter, d'examiner et de juger ce travail.

Monsieur J. Livage Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Madame N. Jaffrezic- Renault, Directeur de Recherche à L'Ecole centrale de Lyon, qui a accepté de prendre connaissance de ce travail et de le juger. Je la remercie tout spécialement pour son accueil chaleureux lors de mes visites.

Madame C. Mousty, Directeur de Recherche à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, qui a accepté de juger et suivre ce travail. Je la remercie pour son aide, ses conseils avisés. Ses avis éclairés m'ont été précieux dans la réalisation de ce travail.

Monsieur Fabrice Leroux, Chargé de Recherche, pour sa disponibilité, son aide et ses remarques constructives dans les études EXAFS et RMN

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont toujours soutenu et aidé pendant toutes ces années et en particulier :

Madame Vanessa Prévot, Chargé de Recherche au CNRS, pour son aide précieuse et renouvelée en microscopie électronique à Transmission.

Monsieur Joël CELLIER, Technicien au CNRS, pour son aide dans la mise au point et la réalisation des expériences de diffraction X sur poudre.

Ainsi que K. ARAUJO DA SILVA avec qui j'ai partagé de bons moments lors de mon monitorat.

Je tiens également à citer les étudiants qui ont eu une grande place pendant mes trois années de thèse : Christelle et Eric (des amis pour la vie), Erwan (qui m'a écouté pendant ma rédaction et je



le remercie de sa patience), Laetitia, Nathalie, Audrey et Céline avec qui j'ai partagé nombreuses discussions, et les autres étudiants (le grand Rachid, le petit Rachid, Farida, Chang, Dan, Yanxia). Je remercie vivement Houcine Barhoumi d'avoir effectué les tests électrochimiques pour évaluer les biocapteurs. Et je tiens à remercier plus spécialement mon coach, Michael, pour son aide, ses conseils, pour avoir été présent dès que j'en avais besoin.

**Puis Merci a ceux qui ont été présents pendant ces huit années d'étude et qui m'ont permis de réaliser mon rêve:**

**Mes parents, ma sœur, mes grand-mères, Zab.**

## *Sommaire*

<i>INTRODUCTION</i> .....	1
---------------------------	---

### *Chapitre 1 : Etude Bibliographique*

<i>I Les Matériaux Intelligents Bioinorganiques</i> .....	11
<i>I.1 Les Matériaux Hybrides Biomimétiques</i> .....	11
<i>I.2 Les Biocapteurs</i> .....	14
 <i>II Les Matériaux Hybrides à base d'Enzyme</i> .....	17
<i>II.1 Généralités sur les Enzymes</i> .....	17
<i>II.1.1 Structure</i> .....	17
<i>II.1.2 Activité</i> .....	19
<i>II.2 Immobilisation des Enzymes sur des Matrices</i> .....	21
<i>II.2.1 L'Immobilisation d'Enzymes : Quel intérêt ?</i> .....	21
<i>II.2.2 Les Différentes Techniques d'Immobilisation</i> .....	23
<i>II.2.2.1 Immobilisation par adsorption</i> .....	24
<i>II.2.2.2 Immobilisation par couplage covalent</i> .....	28
<i>II.2.2.3 Immobilisation par encapsulation</i> .....	32
<i>II.2.2.4 Immobilisation par nanostructuration de films moléculaires</i> .....	36
 <i>III Les Hydroxydes Doubles Lamellaires : Nouvelles Structures Hôtes pour les Enzymes</i> .....	40
<i>III.1 Les Hydroxydes Doubles Lamellaires</i> .....	41
<i>III.1.1 Structure</i> .....	41
<i>III.1.2 Propriétés d'Echange Anionique</i> .....	45
<i>III.2 Les HDL : Composés à Morphologie Contrôlée</i> .....	46
<i>III.2.1 Les Différentes Voies de Préparation</i> .....	46
<i>III.2.2 Effet des Différentes Méthodes de Synthèse sur la Morphologie des Phases HDL</i> ... ..	50

<b>III.3 Les HDL : Structure Hôtes pour les Biomolécules .....</b>	<b>52</b>
<i>III.3.1 Transferts des Biomolécules.....</i>	<i>53</i>
<i>III.3.2 Transferts de Médicaments.....</i>	<i>54</i>
<i>III.3.3 Immobilisation D'enzymes.....</i>	<i>56</i>
<i>III.3.4 Immobilisation de Polluants.....</i>	<i>59</i>

## Chapitre 2 : Préparation de phases $[Zn_2-Al-Cl]$ par décomposition thermique ou enzymatique de l'urée.

<b>I Introduction.....</b>	<b>65</b>
<b>II Etude Bibliographique.....</b>	<b>66</b>
<b>II.1 Synthèse D'HDL par Décomposition Thermique de l'Urée.....</b>	<b>66</b>
<b>II.2 Synthèse D'Oxydes par Décomposition Enzymatique de l'Urée.....</b>	<b>67</b>
<b>III Synthèse de <math>[Zn_2-Al-Cl]</math> par Décomposition Thermique.....</b>	<b>69</b>
<b>III.1 Synthèse.....</b>	<b>69</b>
<b>III.2 Etude des Paramètres influençant la Synthèse.....</b>	<b>70</b>
<i>III.2.1 Effet du Temps de Réaction.....</i>	<i>70</i>
<i>III.2.2 Effet de la Température d'Hydrolyse de l'Urée et du Rapport <math>[Urée]/[Sels]</math>.....</i>	<i>83</i>
<b>III.3 Etude des Propriétés Morphologiques.....</b>	<b>87</b>
<b>III.4 Discussion sur la Formation de la phase HDL <math>[Zn-Al]</math>.....</b>	<b>89</b>
<b>IV Synthèse de <math>[Zn_2-Al-Cl]</math> par Décomposition Enzymatique de l'Urée.....</b>	<b>92</b>
<b>IV.1 Synthèse.....</b>	<b>93</b>
<b>IV.2 Etude Des Paramètres influençant la Synthèse.....</b>	<b>93</b>
<i>IV.2.1 Effet de la Concentration d'Uréase.....</i>	<i>93</i>
<i>IV.2.2 Effet du Temps.....</i>	<i>95</i>
<i>IV.2.3 Effet de la Concentration d'Urée.....</i>	<i>96</i>

IV.2.4	<i>Effet de l'Activité Enzymatique.....</i>	98
IV.3	<b>Etude Morphologique.....</b>	101
IV.4	<b>Discussion.....</b>	103
V	<b><i>Extension des Synthèses à d'autres systèmes HDL [M<sup>II</sup>-M<sup>III</sup>].</i></b>	103
V.1	<b>Hydrolyse Thermique.....</b>	104
V.1.1	<i>Effet des Ions Métalliques en Solution.....</i>	104
V.1.2	<i>Etude Structurale.....</i>	106
V.1.3	<i>Etude Morphologique.....</i>	107
V.2	<b>Hydrolyse Enzymatique.....</b>	108
V.2.1	<i>Effet des Cations.....</i>	109
V.2.2	<i>Etude Structurale.....</i>	111
V.2.3	<i>Comportement de l'Enzyme.....</i>	113
V.2.4	<i>Etude Morphologique.....</i>	113
VI	<b><i>Comportement Thermique des Phases HDL [M<sup>II</sup>-M<sup>III</sup>]</i></b>	
	<b><i>Préparées par Hydrolyse de l'Urée.....</i></b>	115
VII	<b>Conclusion.....</b>	120

### Chapitre 3 : *Adsorption et Désorption de l'Uréase par les phases HDL.*

I	<b><i>Introduction.....</i></b>	127
II	<b><i>Etude Bibliographique.....</i></b>	128
II.1	<b>Adsorption de l'Uréase sur des Matrices Inorganiques ou Organiques.....</b>	128
II.2	<b>Etude de Simulation de l'Adsorption de Protéines sur des Argiles.....</b>	130
II.3	<b>Adsorption d'Enzymes sur des Hydroxydes Doubles Lamellaires.....</b>	132

<b>III</b>	<b><i>Adsorption de l'Urée sur les Phases HDL [Zn<sub>R</sub>-Al]</i></b>	<b>134</b>
<b>III.1</b>	<b>Protocole Expérimental</b>	<b>134</b>
<b>III.2</b>	<b>Etude Cinétique</b>	<b>137</b>
<b>III.3</b>	<b>Résultats Expérimentaux</b>	<b>138</b>
III.3.1	Effet de la Densité de Charge des Feuilles	138
III.3.2	Effet de la Matrice Hôte	143
III.3.3	Effet de la Morphologie de la Matrice Hôte	143
III.3.4	Effet de la Solution Tampon	146
<b>IV</b>	<b><i>Désorption de l'Urée</i></b>	<b>147</b>
<b>IV.1</b>	<b>Protocole Expérimental</b>	<b>148</b>
<b>IV.2</b>	<b>Résultats Expérimentaux</b>	<b>148</b>
IV.2.1	Effet de Désorption avec l'Eau Décarbonatée	148
IV.2.2	Désorption de l'Urée avec une Solution de Tampon Phosphate	149
<b>V</b>	<b><i>Conclusion</i></b>	<b>150</b>

*Chapitre 4 :*  
*Etude du confinement de l'urée dans*  
*des matrices HDL [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl]*

<b>I</b>	<b><i>Introduction</i></b>	<b>157</b>
<b>II</b>	<b><i>Etude Bibliographique</i></b>	<b>157</b>
<b>III</b>	<b><i>Stratégie de Confinement de l'Urée</i></b>	<b>162</b>
<b>III.1</b>	<b>Protocoles Expérimentaux des Synthèses des Matériaux Hybrides HDL [Zn<sub>3</sub>-AL]-Urée</b>	<b>162</b>
III.1.1	L'Echange Anionique	162
III.1.2	La Délamination	162

<i>III.1.3 Coprécipitation.....</i>	<i>163</i>
<b>III.2 Comparaison des Propriétés Structurales et Morphologiques des Différentes Phases [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl]-Uréase.....</b>	<b>163</b>
<i>III.2.1 Etude Structurale.....</i>	<i>163</i>
III.2.1.1 Diffraction des rayons X sur poudre.....	163
III.2.1.2 Spectroscopie infrarouge.....	165
<i>III.2.2 Etude Morphologique par Microscopie Electronique à Balayage.....</i>	<i>167</i>
<b>III.3 Etude Approfondie de la Coprécipitation des Phases [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl]-Uréase.....</b>	<b>170</b>
<i>III.3.1 Résultats Expérimentaux.....</i>	<i>170</i>
<i>III.3.2 Etude Structurale.....</i>	<i>173</i>
III.3.2.1 Diffractions des rayons X.....	173
III.3.2.2 Etude par absorption des rayons X.....	176
III.3.2.3 Spectroscopie infrarouge.....	184
III.3.2.4 Spectroscopie UV-visible.....	185
<i>III.3.3 Etude Morphologique.....</i>	<i>189</i>
III.3.3.1 Perméabilité des phases hybrides HDL/Uréase coprécipitées.....	189
III.3.3.2 Microscopie électronique à balayage.....	191
III.3.3.1 Microscopie électronique à transmission.....	193
 <b>IV CONCLUSION.....</b>	 <b>194</b>

## *Chapitre 5 :*

### *Elaboration de films [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl] et [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl]-Uréase par la méthode Langmuir Blodgett*

<b><i>I Historique.....</i></b>	<b><i>199</i></b>
 <b><i>II Principe de la Technique Langmuir – Blodgett.....</i></b>	 <b><i>200</i></b>
<b>II.1 Les Films Langmuir.....</b>	<b>201</b>
<i>II.1.1 Les Molécules Amphiphiles.....</i>	<i>201</i>
<i>II.1.2 Pression de Surface.....</i>	<i>202</i>
<b>II.2 Les Isothermes Pression – Surface <math>\pi</math> – A.....</b>	<b>203</b>

<b>II.3</b>	<b>Transfert des Films Langmuir.....</b>	<b>205</b>
<b>II.4</b>	<b>Transfert de Films Langmuir incluant des Protéines.....</b>	<b>207</b>
<b>III</b>	<b><i>Etude Bibliographique.....</i></b>	<b>207</b>
<b>III.1</b>	<b>Films LB d'Uréase.....</b>	<b>207</b>
<b>III.2</b>	<b>Films LB d'argile.....</b>	<b>209</b>
<i>III.2.1</i>	<i>Films LB d'Argile Cationique.....</i>	<i>209</i>
<i>III.2.2</i>	<i>Films LB d'Hydroxyde Double Lamellaire.....</i>	<i>211</i>
<b>IV</b>	<b><i>Protocole Expérimental.....</i></b>	<b>214</b>
<b>IV.1</b>	<b>Préparation des Différents Films.....</b>	<b>214</b>
<i>IV.1.1</i>	<i>Préparation de Films Acide Béhénique/[Zn-Al-HDL].....</i>	<i>214</i>
<i>IV.1.2</i>	<i>Préparation de Films Acide Béhénique /Zn-Al-HDL/Uréase].....</i>	<i>215</i>
<b>IV.2</b>	<b>Résultats et Discussion.....</b>	<b>216</b>
<i>IV.2.1</i>	<i>Isothermes Pression- AirE des différents Films LB.....</i>	<i>216</i>
<i>IV.2.1.1</i>	<i>Etudes préliminaires.....</i>	<i>216</i>
<i>IV.2.1.2</i>	<i>Etude de la formation de films LB dans le système binaire [Zn-Al]-BA.....</i>	<i>219</i>
<i>IV.2.2</i>	<i>Etude de la Formation de Films LB dans le Système Ternaire [Zn-Al]-Uréase-BA..</i>	<i>226</i>
<i>IV.2.3</i>	<i>Isotherme Pression Temps d'Equilibre.....</i>	<i>229</i>
<i>IV.2.4</i>	<i>Etude de la Stabilité des Films LB: les Isobares Aire –Temps.....</i>	<i>231</i>
<b>IV.3</b>	<b>Mise en Œuvre des Transferts de Films LB sur Substrats.....</b>	<b>232</b>
<i>IV.3.1</i>	<i>Etude du Transfert.....</i>	<i>234</i>
<i>IV.3.2</i>	<i>Quantification du Transfert.....</i>	<i>235</i>
<b>V</b>	<b><i>Caractérisations des Films Préparés.....</i></b>	<b>238</b>
<b>V.1</b>	<b>Etude sur la Mouillabilité des Films Déposés.....</b>	<b>238</b>
<b>V.2</b>	<b>Etude Structurale par Diffraction des Rayons X.....</b>	<b>239</b>
<b>V.3</b>	<b>Caractérisation des Couches par les Techniques de Microscopie.....</b>	<b>241</b>
<i>V.3.1</i>	<i>Etude par Microscopie Optique et Microscopie Electronique à Balayage.....</i>	<i>241</i>
<i>V.3.2</i>	<i>Etude par Microscopie à Force Atomique.....</i>	<i>243</i>
<b>VI</b>	<b><i>Discussion.....</i></b>	<b>248</b>

<b>VII Conclusion.....</b>	<b>252</b>
----------------------------	------------

## *Chapitre 6 :*

# *Activité de l'uréase immobilisée dans les Hydroxydes Doubles Lamellaires- Réponses du biocapteur*

<b>I Introduction.....</b>	<b>259</b>
----------------------------	------------

<b>II Activité Enzymatique de l'Uréase Immobilisée dans les Hydroxydes Doubles Lamellaires.....</b>	<b>259</b>
---	------------

<b>II.1 Mécanismes liés à l'Activité Enzymatique.....</b>	<b>259</b>
---	------------

<b>II.2 Etude Bibliographique.....</b>	<b>260</b>
--	------------

<b>II.3 Activité Enzymatique.....</b>	<b>264</b>
---------------------------------------	------------

<i>II.3.1 Protocole Expérimental.....</i>	<i>264</i>
---	------------

<i>II.3.2 Activité Enzymatique des Phases Préparées par Coprécipitation.....</i>	<i>266</i>
--	------------

<b>III Réponses du Biocapteur.....</b>	<b>272</b>
--	------------

<b>III.1 Réalisation d'un Biocapteur Enzymatique.....</b>	<b>272</b>
---	------------

<i>III.1.1 Les Biocapteurs à Urée.....</i>	<i>272</i>
--	------------

<i>III.1.2 Les Biocapteurs à Phosphates Organiques.....</i>	<i>274</i>
---	------------

<i>III.1.3 Réponses du Biocapteur.....</i>	<i>276</i>
--	------------

<b>III.2 Etude des Biocapteurs basés sur l'Immobilisation de l'Uréase dans les HDL...</b>	<b>279</b>
---	------------

<i>III.2.1 Principe de la Méthode de Mesure.....</i>	<i>279</i>
--	------------

<i>III.2.2 Réalisation des Biocapteurs.....</i>	<i>280</i>
---	------------

<i>III.2.3 Réponses Electriques des Biocapteurs à Urée.....</i>	<i>281</i>
---	------------

<b>III.3 Discussion.....</b>	<b>285</b>
------------------------------	------------

<b>IV Conclusion.....</b>	<b>287</b>
---------------------------	------------

<b>CONCLUSION .....</b>	<b>289</b>
-------------------------	------------





# Introduction



Les matériaux hybrides bio-inorganiques constituent une nouvelle classe de matériaux à l'interface entre la biologie et la science des matériaux. L'étude des biocapteurs basés sur l'encapsulation d'enzymes dans des matrices inorganiques est un axe de recherche en fort développement. En effet, les enzymes sont de plus en plus utilisées pour la détection moléculaire dans les domaines de l'environnement et de la médecine. Cependant, leur faible stabilité et leur coût élevé nécessitent leur immobilisation dans des matrices solides poreuses et protectrices. L'élaboration de ces « biomatériaux » fonctionnels doit répondre à un cahier des charges sévère imposant en particulier une densité élevée de biomolécules immobilisées dans la matrice inorganique, une bonne accessibilité du substrat, la conservation de l'activité biologique au cours du temps et une stabilité opérationnelle et au stockage.

De nombreuses méthodes d'immobilisation ont été développées pour la réalisation de biocapteurs électrochimiques tels que le greffage covalent ou l'inclusion dans des matrices organiques et inorganiques à charpentes ouvertes. Parmi ces méthodes, le confinement dans des argiles semble être une méthode efficace, pratique, peu coûteuse et sans risque pour l'environnement. Cette biocompatibilité est par ailleurs attestée par l'existence de complexes argiles-enzymes qui jouent un rôle particulier dans la chimie des sols naturels.

La spécificité de cette étude repose sur l'immobilisation d'enzymes dans un réseau bidimensionnel de type Hydroxyde Double Lamellaire (HDL). Les biomolécules portent souvent, dans les conditions de pH du milieu dans lequel elles travaillent, une charge nette négative qui limite leur interaction avec les feuillets positifs des argiles (argiles cationiques). Les Hydroxydes doubles Lamellaires (nommés encore argiles anioniques) apparaissent être des matériaux alternatifs très appropriés. Leur propriété d'échangeur anionique confère au matériau une aptitude à intercaler et à stabiliser une large variété d'anions et en particulier les macromolécules anioniques organiques et les biomolécules comme l'ADN<sup>1</sup>. Les propriétés structurales et électriques de ces matrices hôtes et les conditions de synthèses par Chimie Douce semblent favorables à la formation de composés hybrides HDL-Enzymes. Très récemment, de nouveaux biocapteurs<sup>2,3</sup> basés sur l'immobilisation d'enzymes (uréase et polyphénol oxydase) dans des matrices HDL préparées au laboratoire ont été développés. Les biomembranes HDL-Enzymes présentent une meilleure biocompatibilité et une meilleure

---

<sup>1</sup> J.H. Choy, S.Y. Kwak, J.S. Park, Y. J. Jeong, J. Portier, J American chemical society, 121, 1399-1400, 1999

<sup>2</sup> J.V. de Melo, S. Cosnier, C. Mousty, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Anal. Chem. 74 (2002) 4037-4043.

<sup>3</sup> D. Shan, S. Cosnier, C. Mousty, Anal. Chem. 75 2003 3872-3879.

perméabilité au substrat que des biomembranes équivalentes préparées avec les argiles cationiques (Montmorillonite ou Laponite).

La thématique de recherche sur les Hydroxydes Doubles Lamellaires du laboratoire s'est développée ces dernières années dans le domaine des matériaux hybrides. Les travaux récents<sup>4</sup> ont mis en évidence la capacité qu'ont les HDL de confiner et de structurer dans les domaines interfeuillet des macromolécules organiques comme les polymères. Par ailleurs, les potentialités des matrices HDL comme matériaux d'adsorption<sup>5</sup> de polluants organiques pour des applications dans le domaine de l'environnement ont largement été étudiées et démontrées. Il s'est donc avéré très prometteur d'associer des macromolécules présentant des fonctionnalités chimiques telles que les enzymes aux structures HDL afin d'élaborer de nouveaux matériaux fonctionnels utilisables dans le domaine de la reconnaissance moléculaire ou encore des biotechnologies.

La principale étude de ce travail concerne l'immobilisation de l'uréase dans des matrices HDL de type  $[Zn_R-Al-Cl]$  pour la réalisation de biocapteurs à urée, comme alternative aux électrodes à base d'argiles cationiques ou de polymères organiques. Le choix des HDL comme structures hôtes permet de moduler les propriétés physico-chimiques de la matrice (densité de charge, composition chimique du feuillet, surface spécifique, morphologie) afin de mieux appréhender les interactions molécule invitée/ structure hôte. Cette étude s'intègre dans le cadre d'un programme de recherche ACI Nanosciences (2003 NR 0005) sur les « Synthèses, caractérisations et mises en forme de matériaux nanohybrides Enzymes-Hydroxydes Doubles Lamellaires - Elaboration de biocapteurs électrochimiques appliqués à la détection de polluants aqueux » entre trois partenaires (C. Forano du Laboratoire des Matériaux Inorganiques (LMI- Clermont Ferrand), C. Mousty du Laboratoire d'Electrochimie Organique et de Photochimie redox (LEOPR-Grenoble) et N. Jaffrezic-Renault laboratoire Ingénierie et Fonctionnalisation des Surfaces (IFoS -Lyon)).

Notre étude a porté, en premier lieu, sur le contrôle des propriétés morphologiques de phases HDL  $[Zn_R-Al]$ , précurseurs d'immobilisation de l'uréase. Nous avons étudié la formation de la phase HDL par la méthode de précipitation par l'hydrolyse thermique de l'urée. Trois

---

<sup>4</sup> L. Vieille, E. M. Moujahid, C. Taviot-Guého, J. Cellier, J.P. Besse, F. Leroux, J. Physics and Chemistry Solids, 65 (2-3), 2004, 385-393

<sup>5</sup> F. Li, Y. Wang, Q. Yang, D. G. Evans, C. Forano, X. Duan, J. Hazardous Materials, B125, 2005, 89-95

paramètres ont été étudiés : la température de décomposition de l'urée, la concentration en urée et le temps de mûrissement afin d'apprécier leur influence sur la formation et la composition du matériau. Une nouvelle voie de synthèse d'HDL a été mise en évidence, utilisant l'uréase comme catalyseur de la décomposition de l'urée et de la production d'agent basique précipitant. Cette nouvelle méthode de préparation s'apparente à un processus de biominéralisation ou de biogenèse et a pu être étendue à la préparation de phases HDL de compositions variées.

L'élaboration des nanohybrides enzymes-HDL a été réalisée dans des conditions de chimie douce afin de préserver la structure tertiaire des protéines et donc leur activité. La maîtrise des conditions d'obtention des phases inorganiques nous a permis de réaliser des matériaux hybrides reposant sur diverses associations uréase-HDL. Les chapitres 3 et 4 s'intéressent aux procédés d'intercalation: adsorption ou échange anionique d'uréase dans le précurseur HDL, confinement par précipitation de la phase HDL en présence d'uréase, exfoliation des plaquettes HDL autour de l'enzyme. Ces trois méthodes privilégient des confinements différents des protéines soit aux joints de grains ou en surface de cristallites soit entre les feuillets avec un désordre structural plus ou moins développé. Une étude approfondie et comparative des ces procédés a été réalisée en vue de comprendre et de maîtriser la formation du matériau uréase/HDL, de contrôler la quantité d'uréase immobilisée et de définir une matrice HDL-uréase modèle. La caractérisation structurale et morphologique des matériaux hybrides a été principalement effectuée au laboratoire, la perméabilité des biomembranes uréase/HDL, quant à elle, a été réalisée au LEOPR sous la direction de Christine Mousty.

La réalisation des biocapteurs nécessite la mise en forme des matériaux biologiquement actifs en couche. Nous nous sommes intéressés à la préparation de nanostructures HDL-Uréase orientées en multicouches par la technique de Langmuir-Blodgett. Il s'est agit en premier lieu d'étudier et d'optimiser les conditions d'obtention des films LB binaires HDL-Amphiphile et ternaires HDL-Uréase-Amphiphile. Nous avons ensuite réalisé les transferts et caractérisé les dépôts par diverses techniques de microscopie. La technique de Langmuir-Blodgett a été mise en œuvre à l'IFoS, qui possède un savoir-faire dans la structuration de films mixtes enzymes-amphiphile pour la réalisation de biocapteurs

La dernière partie de ce travail a consisté à la réalisation de tests d'activité enzymatique de l'uréase immobilisée et à la mesure des réponses électriques des biocapteurs. Les mesures électrochimiques ont été réalisées au laboratoire IFoS par Houssine Barhoumi.

# **Chapitre 1**

## **Etude Bibliographique**





## Sommaire

<b><i>I Les Matériaux Intelligents Bioinorganiques .....</i></b>	<b><i>11</i></b>
<i>I.1 Les matériaux hybrides biomimétiques.....</i>	<i>11</i>
<i>I.2 Les biocapteurs .....</i>	<i>14</i>
<b><i>II Les Matériaux Hybrides à Base d'Enzyme .....</i></b>	<b><i>17</i></b>
<i>II.1 Généralités sur les enzymes .....</i>	<i>17</i>
<i>II.1.1 Structure .....</i>	<i>17</i>
<i>II.1.2 Activité .....</i>	<i>19</i>
<i>II.2 Immobilisation des enzymes sur des matrices .....</i>	<i>21</i>
<i>II.2.1 L'immobilisation d'enzymes : Quel intérêt ? .....</i>	<i>21</i>
<i>II.2.2 Les différentes techniques d'immobilisation .....</i>	<i>23</i>
<i>II.2.2.1 Immobilisation par adsorption.....</i>	<i>24</i>
<i>II.2.2.2 Immobilisation par couplage covalent.....</i>	<i>28</i>
<i>II.2.2.3 Immobilisation par encapsulation.....</i>	<i>32</i>
<i>II.2.2.4 Immobilisation par nanostructuration de films moléculaires .....</i>	<i>36</i>
<b><i>III Les Hydroxydes Doubles Lamellaires : nouvelles structures hôtes pour les enzymes .....</i></b>	<b><i>40</i></b>
<i>III.1 Les Hydroxydes Doubles Lamellaires.....</i>	<i>41</i>
<i>III.1.1 Structure .....</i>	<i>41</i>
<i>III.1.2 Propriétés d'échange anionique .....</i>	<i>45</i>
<i>III.2 Les HDL : composés à morphologie contrôlée.....</i>	<i>46</i>
<i>III.2.1 Les différentes voies de préparation .....</i>	<i>46</i>
<i>III.2.2 Effet des différentes méthodes de synthèse sur la morphologie des phases HDL.....</i>	<i>50</i>
<i>III.3 Les HDL : structures hôtes pour les biomolécules.....</i>	<i>52</i>
<i>III.3.1 Transferts de biomolécules.....</i>	<i>53</i>
<i>III.3.2 Transferts de médicaments.....</i>	<i>55</i>
<i>III.3.3 Immobilisation d'enzymes.....</i>	<i>56</i>
<i>III.3.4 Immobilisation de polluants.....</i>	<i>59</i>



## ***I Les Matériaux Intelligents Bioinorganiques***

La recherche de nouveaux matériaux fonctionnels s'oriente actuellement vers les systèmes inspirés par le monde du vivant. L'association de matériaux inorganiques et biologiques permet de développer une diversité de nouveaux matériaux hybrides fonctionnels bénéficiant de la réunion des propriétés des deux composés, par exemple, stabilité chimique et organisation structurale pour les premiers et activité chimique spécifique pour les deuxièmes. C'est le cas de l'élaboration de biocapteurs bio-inorganiques. De tels matériaux sont dits « intelligents ».

Gilles de Rosnay, lors d'une conférence, a défini ces matériaux de la façon suivante. Pendant longtemps, l'homme s'est servi des matériaux naturels tels que le bois, le cuir, la laine pour sa survie, son confort, puis, plus récemment les matériaux synthétiques comme le plastique, les composites ont fait leur apparition. Mais depuis le début des années 80, une nouvelle classe a émergé : les matériaux intelligents. Ces matériaux possèdent des propriétés fonctionnelles associées à des propriétés structurales spécifiques. Ils peuvent avoir un rôle d'activateur (effectuer une action sur son environnement), de capteur (détecter des signaux) et parfois même de processeur (traiter, comparer et stocker des données). Ces composés ont la capacité de modifier leurs propriétés quand ils sont soumis à une excitation extérieure, voire intérieure. Les premiers matériaux dits intelligents, considérés comme de première génération, sont purement synthétiques tels que les matériaux piézoélectriques, magnétostrictifs et les alliages à mémoire de forme. Cependant, l'apparition d'une nouvelle catégorie de matériaux intelligents s'inspirant des propriétés induites par le monde du vivant fait son apparition. La recherche actuelle se consacre plus particulièrement aux développements de biomatériaux structurels et fonctionnels pour des applications biotechnologiques (biopuces, biocapteurs), biomédicales (matériaux de remplacement des tissus mous). Cette nouvelle approche d'élaboration de matériaux intelligents s'intègre dans un domaine de recherche dit biomimétique.

### ***1.1 Les matériaux hybrides biomimétiques***

Le biomimétisme est une nouvelle approche scientifique qui étudie les organismes vivants comme modèles fonctionnels et puis les imite ou s'inspire de leur design, de leurs procédés.

La nature<sup>1</sup> a démontré la faisabilité de synthétiser, dans des conditions thermodynamiques normales (température ambiante, pression atmosphérique, solvant aqueux), des matériaux possédant des propriétés mécaniques remarquables nées de l'association entre matière organique et inorganique. Ces matériaux composites tel que l'email dentaire, la nacre de coquillages, les os possèdent une microstructure constituée de particules inorganiques (carbonate de calcium, hydroxyapatite, silice) construite à l'interface de polymères organiques (collagène, polysaccharide, chitine). Le schéma classique de formation des biocomposites comprend une première étape de préorganisation, suivie d'une étape de minéralisation. Le réseau inorganique précipite dans un milieu organique ordonné. La morphologie révèle alors une structure hiérarchisée et bien définie dans une échelle de taille variable. La présence du composé minéral apporte une amélioration des propriétés mécaniques (rigidité) alors que le matériau organique accroît la flexibilité. Ce compromis confère aux matériaux hybrides des performances inégalables. La recherche scientifique va donc s'inspirer de ces phénomènes pour améliorer ses matériaux synthétiques ou en développer de nouveaux. Le principe est, donc, de précipiter des matériaux hybrides pour obtenir de nouvelles propriétés.

- L'utilisation d'agents structurants organiques, biologiques permet l'édification de matériaux minéraux poreux, fibreux. Dans son ouvrage, Stephen Mann<sup>2</sup> décrit l'utilisation des concepts de biominéralisation pour l'élaboration de biomatériaux inspirés, basés sur l'édification d'une architecture organisée et de forme complexe. De par les observations faites de la nature, il est possible de jouer sur la porosité des matériaux inorganiques (taille de pores des zéolithes), sur l'assemblage par exemple de particules d'or reliées entre elles par un système anticorps - antigène.

- Depuis, les années 80, les polymères<sup>3,4,5</sup> sont renforcés par des matériaux inorganiques pour améliorer les propriétés mécaniques, thermiques et de barrières (gaz, eau). L'idée de base est de synthétiser des matériaux hybrides à travers une combinaison synergique de céramiques ou d'argiles et de polymères. Ces matériaux ont été principalement obtenus soit par voie sol-gel, soit par intercalation de polymères dans des matériaux lamellaires, ou exfoliation de plaquettes d'argiles dans une matrice polymère. L'intérêt de ces matériaux est en particulier dû à l'effet considérable du facteur de forme sur les propriétés du nanocomposite.

---

<sup>1</sup> J. Hay , S. Shaw , Chemistry in Britain, Into the labyrinth, November 2001

<sup>2</sup> S. Mann Biomineralization- Principles and concepts in Bioinorganic Materials Chemistry, Oxford University press, 2001

<sup>3</sup> J. N. hay, S. J. Shaw, Europhysics News, vol 34 N° 3, 2003

<sup>4</sup> Z. Ahmad, J.E Mark, Materials Science and Engineering C 6, 1998, 183-196

<sup>5</sup> M. Alexandre, P. Dubois, Materials Science and Engineering, 28, 2000, 1-63

- Un autre objectif concerne la modification d'un matériau inorganique en présence de polymères. La composante organique permet d'introduire une meilleure flexibilité. Par exemple dans le domaine médical, l'utilisation de matériaux vitrocéramiques bioactifs<sup>6</sup> a montré un usage attractif comme implants dans des os défectueux. Cependant, ces matériaux sont plus cassants et moins flexibles que les os naturels. Ils ont pu être optimisés par association avec un polymère plus flexible et ont atteint des performances mécaniques comparables à celles du vivant.

- L'implantation d'espèces organiques actives incorporées dans des matrices inorganiques a permis d'améliorer la stabilité chimique et les propriétés mécaniques du matériau ou de développer de nouvelles propriétés fonctionnelles. L'élaboration de capteurs plus performants a ainsi été développée. Par exemple, les biocapteurs<sup>7</sup> issus de l'immobilisation d'enzymes, de bactéries sont des dispositifs intéressants pour l'analyse biomédicale et environnementale.

Pour illustrer ce concept de biomimétisme c'est-à-dire de mimer la nature ou de s'en inspirer, l'intercalation de métalloporphyrines<sup>8</sup> dans des hydroxydes doubles lamellaires est un exemple significatif. Les métalloporphyrines sont des molécules de synthèse capable de reproduire la plupart des réactions catalysées par l'enzyme cytochrome P-450. L'intérêt d'incorporer ces molécules actives dans une matrice inorganique réside dans l'obtention d'un catalyseur plus stable, mais aussi plus facile à récupérer et à réutiliser. En effet, les propriétés physico-chimiques de la matrice hôte, telle qu'une stabilité à la température, renforcent le comportement de la molécule invitée vis-à-vis de cette sollicitation.

Tous ces exemples montrent l'étendue du développement de tels matériaux. « Le biomimétisme suggère des matériaux hybrides (inorganique-organique/biologique) dont la synthèse chimique et l'édification architecturale sont un défi majeur en science des matériaux : les procédés d'élaboration n'en sont pour l'instant qu'à l'aube de leur développement. Les deux principales difficultés sont d'organiser l'architecture du matériau à une échelle très fine (10-100 Å) et de maîtriser les propriétés des interfaces et des interphases. »<sup>9</sup>

---

<sup>6</sup> C. Ohtsuki, T. Miyazaki, M. Tanihara, Materials Science and Engineering C 22, 2002, 27-34

<sup>7</sup> X. Tan, M. Li, P. Cai, L. Luo, X. Zou, Analytical Biochemistry 337, 2005, 111-120

<sup>8</sup> Sylvie Bonnet, Thèse, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 1997

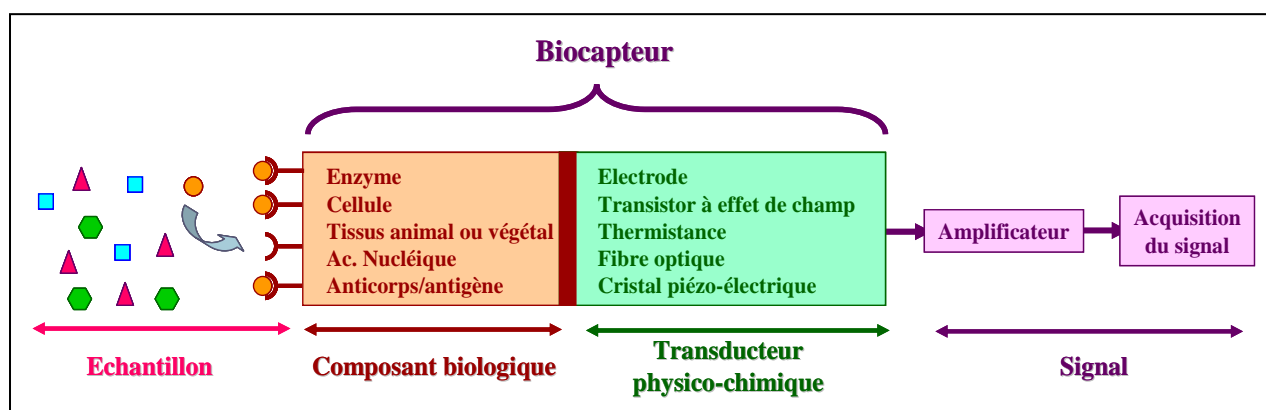
<sup>9</sup> Arago 25, Biomimétisme et Matériaux, Rapport de synthèse du Groupe "Biomimétisme et matériaux" de l'Observatoire Français des Techniques Avancées, 2001

## I.2 Les biocapteurs

La détection de molécules reste toujours un challenge important que ce soit pour le diagnostic médical, le contrôle de la qualité de produits manufacturés ou bien le suivi des paramètres environnementaux (qualités des eaux naturelles). Les biocapteurs<sup>10</sup> ont fait leur apparition comme dispositifs biotechnologiques de contrôle dans les domaines tels que la médecine, l'environnement, l'agro-alimentaire.

Un biocapteur est basé sur l'association de deux composantes (Figure 1) :

- un biorécepteur constitué d'espèces biologiques qui vont reconnaître la molécule cible,
- un transducteur qui transforme l'événement de reconnaissance en un signal mesurable.



**Figure 1 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur**

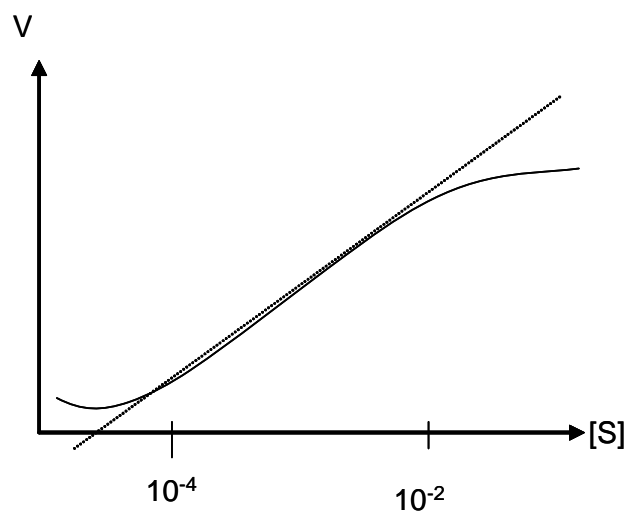
Les biorécepteurs assurent la reconnaissance moléculaire de l'espèce à identifier, par complexation ou transformation de ce composé. Les récepteurs moléculaires peuvent être par exemple des enzymes, des anticorps, des brins d'ADN, des cellules, des micro-organismes. Ces biomolécules actives permettent alors la détection ou la modification d'un substrat en un produit détectable par le transducteur, l'avantage outre la sélectivité de détection étant de pouvoir mesurer l'espèce cible en très faibles concentrations (nanomolaire) dans un milieu complexe. Les développements dans le domaine des biocapteurs ont porté en grande partie sur l'utilisation d'enzymes.

Le deuxième élément constituant le biocapteur est un transducteur. Son principe consiste à convertir en un signal électrique la détection chimique du substrat. Les transducteurs étudiés sont principalement électrochimiques. Toutefois, dans l'intention d'obtenir un signal plus précis, sensible et exploitable, d'autres types de mode de détection apparaissent comme les détections optiques, thermiques, piézo-électriques.

<sup>10</sup> Tran Minh Canh, Les biocapteurs, collection mesures physiques, Masson, 1991

La mise en forme d'un tel dispositif consiste à déposer une fine couche d'enzyme sur la surface sensible (variation électronique ou chimique) du transducteur. La face externe de la couche enzymatique est immergée dans la solution contenant le substrat à analyser. Cependant, plusieurs paramètres sont importants pour une meilleure efficacité du biocapteur. La solution doit être bien agitée pour faciliter le transport du substrat vers la couche enzymatique. L'épaisseur et la structure de la couche enzymatique doivent faciliter la diffusion du substrat vers le site actif et doivent permettre la propagation du produit de la réaction (molécules, ions, électrons) vers la couche sensible du transducteur, appropriée à la réaction enzymatique.

Pour déterminer les performances du biocapteur, une droite d'étalonnage mesurant la réponse électrique du capteur à différentes concentrations d'analyte est réalisée (Figure 2). Cette droite est délimitée par deux plateaux. Celui correspondant aux faibles concentrations informe sur la limite de détection du biocapteur alors que celui correspondant aux concentrations les plus élevées est lié à la saturation des sites actifs par le substrat. La droite, quant à elle, caractérise l'évolution de la variation de potentiel du transducteur entraînée par l'augmentation de la concentration. La pente alors obtenue caractérise la sensibilité du biocapteur. De plus, cette droite renseigne sur le domaine de concentrations de substrat détectable par le transducteur.



**Figure 2 : Droite d'étalonnage<sup>10</sup>**

La limitation du biocapteur provient en particulier de la sensibilité de l'enzyme. Les écarts de température, de pH et le vieillissement engendrent la dénaturation de l'enzyme, et par conséquent la performance du biocapteur.



Par exemple, un biocapteur électrochimique<sup>11</sup> sensible à la détection de phénol a été réalisé par dépôt d'une couche de tyrosinase à la surface d'un transducteur ISFET (sensible à la variation de la composition ionique du milieu). Les performances du biocapteur ont été examinées en fonction du pH et révèlent une réponse optimale à pH = 6 correspondant au pH optimum de l'activité enzymatique de cette enzyme. Dans les conditions optimales (pH, concentration d'enzyme), les courbes de calibration (Figure 3) permettent de déterminer un domaine de concentration détectable de phénols entre 0,2 et 7,8 mM, avec une sensibilité d'environ 2 mV/nM. La stabilité de ces biocapteurs diminue faiblement pendant 15 heures de tests. Pour prolonger leur durée de vie, il est nécessaire de les conserver à 4 °C. Cependant, 13 % des performances du biocapteurs ont été diminué après 5 jours de stockage, puis la réponse a été stable pendant 11 jours.

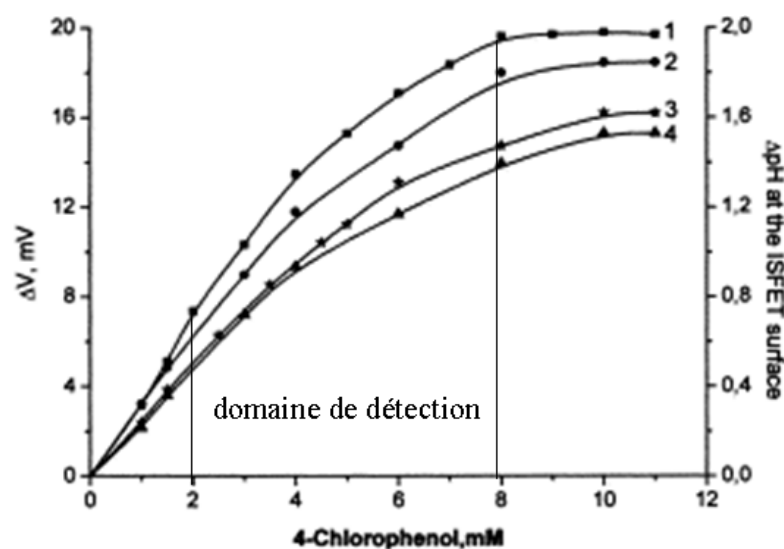


Figure 3 : Courbes de calibration de la détermination de 4-chlorophénol

Toute cette variété de biorécepteurs et de transducteurs permet la multiplication des systèmes de détections biologiques qui aboutit à une diversification d'applications. Les développements actuels visent à obtenir des biocapteurs de plus en plus fiables et de plus en plus appropriés aux types de détection. Il est à noter cependant qu'une des étapes clés dans l'élaboration des biocapteurs réside dans l'immobilisation de la molécule sélective au niveau du transducteur.

Les principes de transducteurs basés sur des biocapteurs à urée ou phosphate organique seront discutés à titre d'exemple dans le chapitre 6.

<sup>11</sup> T. Mai Anh, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, N. Duc Chien, N. Jaffrezic-Renault, J. M. Chovelon, Talanta, 56, 2002, 627-634

## II *Les Matériaux Hybrides à Base d'Enzyme*

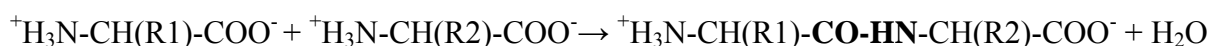
### II.1 *Généralités sur les enzymes*

Les enzymes sont des protéines fonctionnelles, de masse moléculaire élevée, thermolabiles. Ce sont des biocatalyseurs des réactions métaboliques. Elles augmentent la vitesse de réaction sans modifier leur état d'équilibre et sont régénérées à la fin du cycle réactionnel. Elles agissent à de faibles concentrations, possèdent une spécificité étroite ou lâche avec le substrat.

#### II.1.1 *Structure*

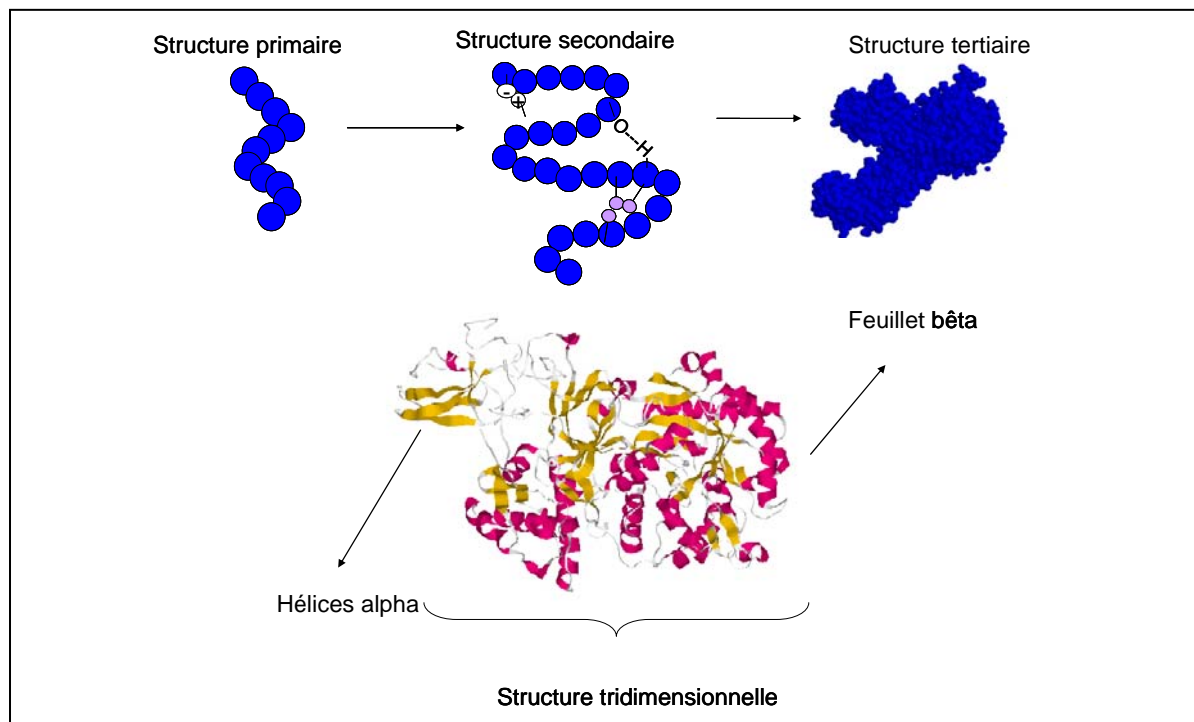
Les enzymes sont des protéines, des macromolécules constituées de chaînes d'acides aminés. Les acides aminés sont des molécules polyfonctionnelles qui comportent au moins une fonction acide carboxylique et une fonction amine portées par le même carbone. Il existe 20 acides aminés courants qui se différencient par la nature de la chaîne latérale, leur comportement hydrophile ou hydrophobe, leur propriété de charge électrique.

Les acides aminés se relient entre eux grâce à des liaisons peptidiques qui se forment par condensation entre le groupe  $\alpha$ -carboxylique du premier acide aminé et la fonction  $\alpha$ -aminée de la deuxième molécule avec élimination d'une molécule d'eau.



Quand deux acides aminés se réunissent, ils forment un peptide. Si la chaîne s'agrandit, on parle d'oligopeptides puis de polypeptides lorsqu'on dépasse 20 acides aminés. A ce niveau là, la macromolécule se définit comme une protéine. De plus, les interactions faibles telles que des liaisons hydrogène, des interactions électrostatiques, de type Van der Waals, hydrophobes entre les différents acides aminés entraînent le repliement de la molécule (Figure 4). On passe alors d'une structure primaire (chaîne d'acides aminés) à une structure secondaire. A ce niveau d'organisation, il existe deux types de conformations : l'hélice alpha et le feuillet bêta. L'hélice alpha est composée d'une chaîne d'acides aminés en spirale. Le feuillet bêta est composé de chaînes disposées parallèlement les unes par rapport aux autres et formant une membrane plissée. La forme finale, qu'adopte une protéine suivant une structure tridimensionnelle, est appelée structure tertiaire. La structure quaternaire est l'association de plusieurs polypeptides. Les enzymes se différencient par leur séquence d'acides aminés qui leur sont propres et leur structure est due à la

nature de ces unités. En effet, les molécules hydrophobes ont tendance à se replier à l'intérieur de la protéine alors que les groupements moléculaires facilement ionisables et hydrophiles s'orientent préférentiellement à la surface de la macromolécule, en interaction avec le milieu aqueux environnant.



**Figure 4 : Les différents niveaux de structuration des protéines**

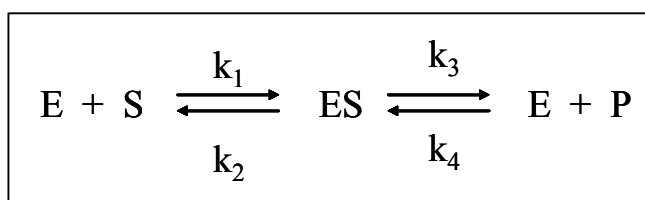
Les enzymes sont des molécules amphotères, elles peuvent être chargées positivement, négativement ou être électriquement neutre selon le pH de la solution dans laquelle elles se trouvent. La charge nette d'une protéine est la somme des charges positives et négatives de ses extrémités et des chaînes latérales des acides aminés qui la composent. Le point isoélectrique (p.i.e) correspond au pH où la charge nette de la molécule est égale à 0. Les protéines sont alors chargées positivement quand  $\text{pH} < \text{p.i.e}$  et négativement pour  $\text{pH} > \text{p.i.e}$ .

La nature des différents acides aminés qui la compose influence les propriétés de l'enzyme au niveau de son encombrement stérique, de son point isoélectrique (c'est-à-dire de son comportement basique ou acide), de l'affinité vis-à-vis de l'eau (plutôt hydrophile ou hydrophobe) et de la réactivité du site actif. La rétention des protéines peut avoir lieu sur des matrices chargées positivement ou négativement, dans les conditions où le pH d'utilisation entraîne une opposition de charges entre l'enzyme et le solide.

### II.1.2 Activité

Une enzyme est<sup>12</sup>, une protéine qui agit comme catalyseur dans une réaction chimique, c'est-à-dire qu'elle accroît les vitesses réactionnelles. L'énergie d'activation de la réaction est alors abaissée. Chaque enzyme « reconnaît » spécifiquement une ou plusieurs molécules selon un principe de complémentarité de type clé-serrure, grâce à des sites de reconnaissance et de fixation situés à sa surface. Ce sont des catalyseurs spécifiques puisqu'elles ne peuvent participer qu'à des réactions bien déterminées. A la fin du processus, l'enzyme retrouve sa structure. Il est à noter que les enzymes participent aux réactions ayant lieu dans les organismes vivants. De ce fait, l'enzyme fonctionne dans des conditions douces de température, de pH et de pression.

La réaction catalytique se déroule au niveau du site catalytique dit site actif de l'enzyme, situé dans la poche protéique, cavité aux caractéristiques structurales et chimiques spécifiques. Le site actif de certaines protéines appelé apoenzyme ne peut être efficace que par l'intermédiaire d'un cofacteur. Ce dernier de type métallique (cuivre, zinc, manganèse) ou de type organique (coenzyme) se fixe sur la région catalytique pour favoriser la réaction chimique et aussi contribuer à la stabilité de l'enzyme. La réaction ne peut se dérouler que par la combinaison de l'apoenzyme avec le cofacteur. La substance chimique cible, nommée substrat (S), se fixe sur l'enzyme (E) au niveau du site actif qui permet la réaction. Il se forme alors un complexe intermédiaire ES. Après réaction, le produit (P) est libéré et l'enzyme régénérée. Ce processus s'effectue des milliers de fois à la seconde :



Pour déterminer la vitesse de réaction catalytique, on utilise l'équation de Michaelis-Menten qui s'écrit comme suit :

$$V_0 = \frac{V_{\max} [\text{S}]}{[\text{S}] + K_M}$$

<sup>12</sup> M. Chaplin, C. Bucke, Enzyme Technology, Cambridge University Press, 1990

Où  $V_0$  est la vitesse initiale de réaction qui détermine l'activité enzymatique,  $V_{\max}$  la vitesse maximale,  $[S]$  la concentration du substrat et  $K_M$  la constante de Michaelis (affinité substrat-enzyme).

L'activité enzymatique peut être réduite ou annulée lors de la dénaturation de l'enzyme (modification structurale, rupture de liaisons) provoquée par la chaleur, par les variations de pH, des concentrations ioniques trop élevées, ou par l'action chimique de solvants organiques. Le site actif peut aussi être modifié et donc devenir inactif provoquant la perte des propriétés catalytiques. Deux types d'inhibition existent. L'inhibition compétitive fait intervenir une molécule imitant le substrat. Il intervient une compétition entre ces deux composés provoquant la diminution, voire la perte de l'activité enzymatique. L'activité catalytique d'une enzyme peut diminuer et même complètement s'arrêter au contact de certaines substances chimiques. L'inhibition non compétitive, quant à elle, engendre une déformation du site actif lors de la fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme en un autre point que le site actif.

L'union internationale de Biochimie a élaboré une nomenclature des enzymes pour permettre une meilleure identification. Une enzyme est spécifique à une réaction chimique. La classification des enzymes va donc s'appuyer sur ce point et répertorier les macromolécules de la façon suivante : EC  $X_1.X_2.X_3.X_4$ . Les nombres de la commission d'enzymes (EC) répartissent six groupes de réactions allant de 1 à 6 ( $X_1$ ). Les réactions catalytiques principales sont les suivantes :

- 1 : les oxydoréductases. Elles interviennent dans des réactions redox qui mettent en jeu des transferts d'atomes d'hydrogène, d'oxygène ou d'électrons entre les molécules.
- 2 : les transférases. Elles catalysent le transfert d'un atome ou d'un groupe d'atomes entre deux molécules mais exclut les réactions redox.
- 3 : les hydrolases. Elles impliquent la coupure de liaisons du substrat avec fixation des radicaux H et OH issus de l'eau.
- 4 : les lyases. Elles interviennent dans des réactions d'élimination d'un groupe d'atomes du substrat.
- 5 : les isomérases. Elles favorisent le changement de conformation du substrat.
- 6 : les ligases. Elles interviennent lors de la formation de liaisons covalentes entre deux molécules, en faisant intervenir l'énergie libérée lors de l'hydrolyse d'un nucléoside triphosphate (ATP).

Les valeurs  $X_2.X_3.X_4$  permettent une meilleure distinction des enzymes en fonction de la nature de la réaction.

Une autre nomenclature intervient dans l'appellation des enzymes. Elle prend en compte le nom du substrat, le type de réaction catalysée et se termine par ase.

Ainsi pour désigner par exemple la glucose oxydase, on utilise les deux appellations de la façon suivante : EC 1.1.3.4 et oxygène 1 oxydoréductase.

Il est important de définir l'implication de l'enzyme lors de la réaction chimique. La quantité d'enzyme présente ou utilisée dans un processus est difficile à déterminer en terme absolu (par exemple : gramme), puisqu'une enzyme possède des proportions variables de matière active et inactive. En effet, la vitesse de réaction est liée à l'activité enzymatique qui se définit comme une unité/masse de protéine. Cette unité libère une micromole de produit par minute dans les conditions optimales en terme de pH, de force ionique et de température.

Pour résumer, l'activité enzymatique est définie par rapport à différents paramètres tels que la température, le pH, le domaine de stabilité de pH, les constantes cinétiques ( $K_M$ ,  $V_{max}$ ).

## ***II.2 Immobilisation des enzymes sur des matrices***

### ***II.2.1 L'immobilisation d'enzymes : Quel intérêt ?***

L'utilisation d'enzymes est de plus en plus employée dans les secteurs industriels. Par exemple, l'industrie agroalimentaire se sert d'elles pour remédier à des déficiences naturelles des ingrédients, pour élaborer des procédés de fabrication. L'industrie des détergents (90% des lessives contiennent des enzymes), l'industrie médicale (traitements thérapeutiques) ont aussi recours à ces biomolécules actives.

Le développement de nouvelles méthodes analytiques pour la recherche et l'industrie fait de plus en plus appel à l'utilisation d'enzymes spécifiques. Cependant le coût de production des enzymes demeure prohibitif. En effet, il faut d'abord les extraire de milieux biologiques puis les purifier. De plus, du fait de leur solubilité souvent élevée, les enzymes peuvent être contaminées par le produit de réaction qui se trouve dans la même phase. L'enzyme est souillée et sa purification entraîne de nouvelles dépenses. De plus avec le temps, les enzymes<sup>9</sup> se dénaturent et donc ne fonctionnent plus aussi efficacement. Il est nécessaire de les remplacer après plusieurs cycles d'utilisation, mais cela implique des dépenses supplémentaires. Il est donc essentiel de trouver une méthode pour stabiliser les enzymes contre leur dénaturation.

L'immobilisation d'enzymes dans des matrices solides ou dans des gels permet la séparation de la protéine et du produit de réaction, dans deux phases différentes, empêchant la contamination avec le produit. Ce procédé permet alors la réutilisation de la biomolécule. Les matériaux d'immobilisation les plus utilisés sont des matériaux chimiquement inertes, insolubles et rendant insoluble l'enzyme. Ce sont plus particulièrement des matrices polymériques et inorganiques mono, bi, ou tridimensionnelles.

Certains problèmes peuvent intervenir pendant l'immobilisation comme la perte de l'activité enzymatique. La diffusion du substrat et du produit peut être gênée par cloisonnement de l'enzyme dans la matrice. L'enzyme peut avoir une conformation plus contraignante dans son état immobilisé, provoquant une diminution de son activité ou bloquant son site catalytique. Les matrices de confinement doivent donc permettre la libre diffusion du substrat vers le site actif et favoriser une conformation spatiale suffisamment libre pour préserver son activité biologique. Si ces conditions sont respectées, les avantages de l'immobilisation sont la limitation du relargage provoquée par les rinçages, une enzyme plus stable et une reproductibilité et durée de vie accrues.

L'immobilisation d'enzymes sur une matrice organique ou inorganique entraîne une diminution de l'activité enzymatique. Cependant, les tests effectués pendant plusieurs jours montrent que l'activité de l'enzyme immobilisée est plus stable que celle de l'enzyme libre.

Par exemple, l'immobilisation de la tyrosinase<sup>13,14</sup> sur des argiles de type montmorillonite, dont le procédé d'immobilisation sera discuté plus en détail dans la partie suivante, engendre une diminution de l'activité enzymatique entre 19,3 et 62,1 % en fonction des propriétés de la matrice. Cette perte est provoquée en particulier par quelques perturbations conformationnelles de l'enzyme ou un blocage stérique du site actif lors de son immobilisation. Ce changement de conformation peut être détecté par spectroscopie infrarouge qui montre un léger décalage de bandes amide I ou amide II de l'enzyme. Cependant, après 30 jours de stockage à 4°C et 25 °C, l'enzyme libre ne retient que 63 % et 33% de son activité initiale, alors que l'enzyme immobilisée conserve, elle, 91% et 49 %, respectivement. Ces résultats confirment l'intérêt d'immobiliser l'enzyme pour une réutilisation plus conséquente par rapport à l'enzyme libre.

---

<sup>13</sup> A. Naidja, A. Violante, P. M. Huang, *Clays and Clay Minerals*, 43,n°6, 1995, 647-655

<sup>14</sup> A. Naidja, P. M. Huang, J. M. Bollag, *J Molecular Catalysis A : Chemical*, 115, 1997, 305-316

### II.2.2 Les différentes techniques d'immobilisation

L'immobilisation peut être considérée comme une séparation physique, durant l'opération continue, du catalyseur (cellule, fraction de cellules ou enzyme) à partir du solvant de telle façon que les molécules de substrats et de produits peuvent être échangées entre les phases. La séparation du catalyseur au solvant peut être réalisée par liaison réversible ou irréversible à la surface d'un support solide ou par piégeage de la protéine dans une matrice organique ou inorganique insoluble. Le choix du type d'immobilisation dépend fortement de la nature de l'application désirée. Par exemple le couplage covalent de l'enzyme est souvent utilisé pour l'élaboration de biocapteurs, alors que l'encapsulation de biomolécules est adaptée aux relargages dans des cellules vivantes afin de libérer la molécule active au niveau de sa cible lors de traitements thérapeutiques. En outre, les propriétés physico-chimiques de l'enzyme doivent être prises en compte. Les enzymes sont sensibles aux changements de température et de pH et présentent une activité optimale dans un domaine précis de ces paramètres. Il est donc nécessaire de les associer à la matrice dans les conditions favorables à leur préservation, c'est-à-dire d'élaborer des matériaux hybrides dans des conditions douces de synthèse (procédés de Chimie Douce). Dans cette partie, nous présentons les différents modes d'immobilisation de l'enzyme et les différentes matrices de confinement utilisées. La Figure 5 résume schématiquement ces différentes techniques d'immobilisation et la nature des matrices utilisées.

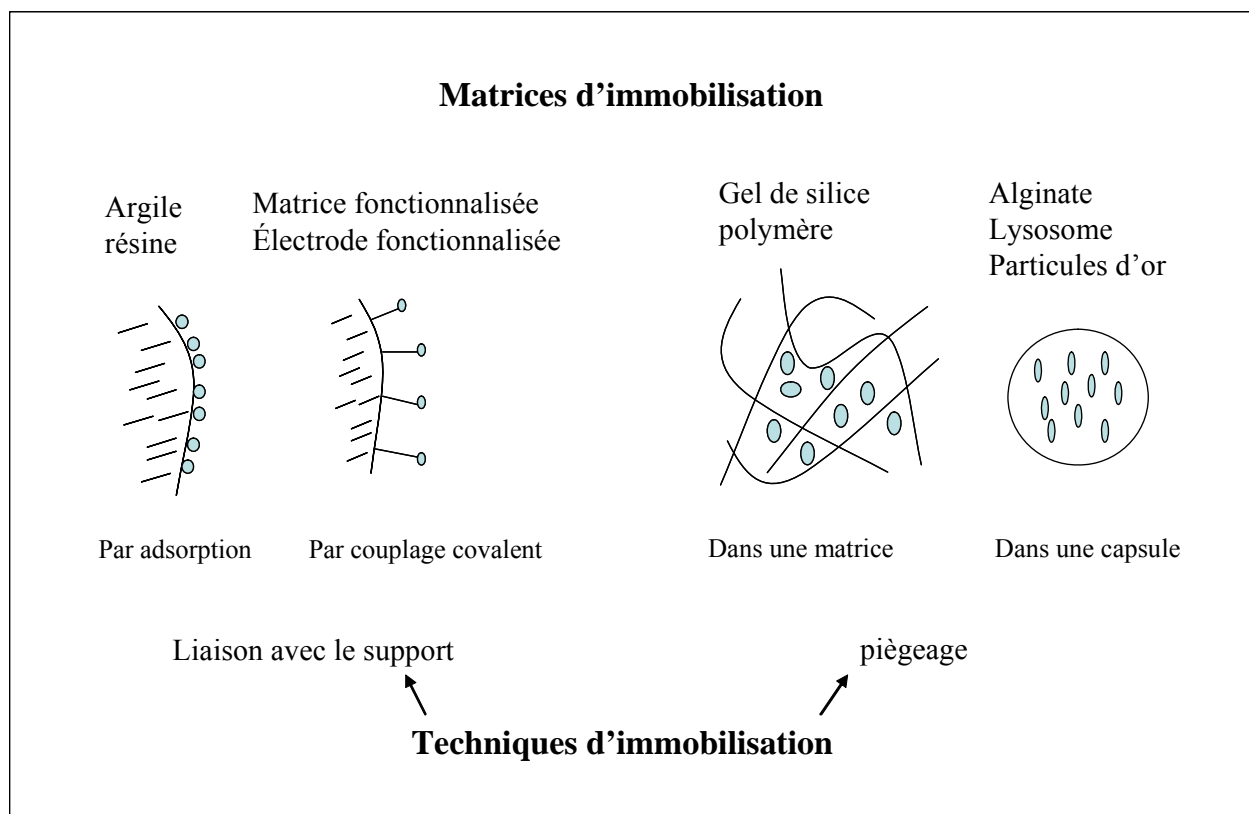


Figure 5 : Les différentes techniques d'immobilisation d'enzymes et les types de matrices



### II.2.2.1 Immobilisation par adsorption

L'adsorption d'enzymes sur des matrices insolubles est la méthode la plus simple d'immobilisation. La procédure implique l'incubation de la protéine avec l'adsorbant dans des conditions appropriées (pH, force ionique, température). Le matériau hybride est récupéré après filtration ou centrifugation. Les interactions qui existent entre l'enzyme et l'adsorbant, sont des interactions faibles de type électrostatiques ou Van der Waals. Cependant, le procédé d'adsorption est réversible et peut conduire dans certaines conditions d'utilisation à la désorption de la biomolécule et donc à l'altération du matériau. Toutefois des différents modes d'immobilisation, l'adsorption est la méthode qui induit le moins de modification de la conformation de l'enzyme active, c'est pourquoi c'est la technique préférée pour l'immobilisation d'enzymes.

Le tableau<sup>15</sup> ci-dessous récapitule le type de matrice utilisée pour l'immobilisation par adsorption.

**Tableau 1 : Les différentes matrices utilisées pour l'adsorption**

Matrices utilisées pour l'adsorption d'enzymes
<u>Matrices inorganiques :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Alumine</li> <li>▪ Verre poreux</li> <li>▪ Hydroxyapatite</li> <li>▪ Carbonate de calcium</li> <li>▪ Gel de phosphate de calcium</li> <li>▪ Gel de silice</li> <li>▪ argiles (bentonite, kaolin)</li> <li>▪ carbone</li> </ul>
<u>Matrices organiques :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Polymères phénoliques</li> <li>▪ Résines échangeuses d'ions</li> </ul>
<u>Matrices biologiques :</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ cellulose</li> <li>▪ collagène</li> </ul>
Concanavalin A-sepharose

<sup>15</sup> J. Woodward, Immobilised cells and enzymes : a practical approach, IRL Press, Oxford, 1985

L'adsorption des enzymes sur des supports inorganiques conduit à des résultats différents selon la nature de la biomolécule ou de la matrice minérale.

L'utilisation des argiles comme matrices d'immobilisation présente de nombreux avantages. Leurs surfaces spécifiques élevées, leur facilité de dispersion/récupération dans l'eau, leur grande capacité d'adsorption, leur forte résistance mécanique ainsi que leur faible coût confèrent à ces matériaux un intérêt attractif pour le confinement d'enzymes.

Des phyllosilicates (Montmorillonite, Sépiolite et Palygorskite), argiles échangeuses de cations et la duolite, une résine échangeuse d'anions ont été utilisés pour l'immobilisation de lipases<sup>16</sup> (*Rhizomucor miehi* (RML) et *condida cylindracea* (CCL)) de poids moléculaires différents (30 kDa et 60 kDa, respectivement). Les phyllosilicates possèdent plusieurs types de structure : lamellaire pour la montmorillonite ou fibreuse pour la sépiolite et la palygorskite. Quelle que soit la matrice d'immobilisation, les pourcentages d'immobilisation sont légèrement plus élevés pour la CCL par rapport à la RML (Tableau 2).

**Tableau 2: Pourcentages d'immobilisation et activités enzymatiques des enzymes *Rhizomucor miehi* (RML) et *condida cylindracea* (CCL) immobilisées sur argiles et résines**

Derivative	mg. of added protein/g derivative	Loading (mg protein fixed/g derivative)	% Immobilisation	Tributyrin activity (mM min <sup>-1</sup> mg protein <sup>-1</sup> )
SEP-RML	42	30.2	72	0.090
	63	40.8	63	0.092
	105	44	42	0.138
PAL-RML	42	28.1	67	0.090
	63	47.9	76	0.027
	105	88.2	84	0.005
MON-RML	42	30.7	73	0.090
	63	55.4	88	0.016
	105	78.7	74	0.008
DUO-RML	42	36.5	87	0.033
SEP-CCL	28	23.5	84	0.020
	45	36	80	0.055
	90	48.6	54	0.025
PAL-CCL	28	22.7	81	0.050
	45	32.8	73	0.023
	90	50.4	56	0.008
MON-CCL	28	24.4	87	0.071
	45	44.1	98	0.038
	90	43.2	48	0.005
DUO-CCL	28	26.9	96	0.016
	45	35	78	0.008

Cependant, la capacité d'adsorption des différentes matrices est beaucoup plus faible pour l'enzyme la plus grosse. En effet, une analyse des solutions par électrophorèse a révélé une sélectivité d'adsorption quasi similaire pour les argiles. La bande caractéristique du poids

<sup>16</sup> I.E. de Fuentes, C. A. Viseras, D. Ubiali, M. Terreni, A. R. Alcantara, J. Mmolecular Catalysis B: Enzymatic 11, 2001, 657-663,

moléculaire (30 kDa) de la RML n'est pas présente après adsorption alors que celle à 60 kDa de la CCL est identifiée. Ce résultat montre que l'immobilisation n'est pas complète pour l'enzyme de poids moléculaire plus élevé. Les matrices utilisées sont plus adéquates aux enzymes de petites tailles, spécialement les fibreuses qui ont une géométrie appropriée à la structure de l'enzyme.

Le mécanisme d'adsorption des enzymes sur ces matrices inorganiques est un mécanisme d'adsorption par échange d'ions. Il dépend fortement de la matrice elle-même. Pour la duolite (résine échangeuse d'anion), les interactions entre les groupements carboxyliques de l'enzyme et la charge positive à la surface de la matrice sont responsables de l'adsorption. Par contre, pour les pylosilicates, chargées négativement, de Fuentes et coll supposent que l'adsorption se fait par échange de cations sur les résidus silanols, le mécanisme d'adsorption impliquant plus particulièrement la charge positive des acides aminés protonés des enzymes. De plus l'absence de désorption indique que des interactions additionnelles de nature hydrophobe entre le support et les enzymes existent.

Huang<sup>13,14,17</sup> et coll. se sont intéressés à l'adsorption de la tyrosinase sur des montmorillonites pures, des montmorillonites modifiées par des hydroxydes d'aluminium ( $\text{Al}(\text{OH})_x\text{-Mont}$ ) et par la birnessite ( $\delta\text{-MnO}_2$ ), afin de comprendre les phénomènes d'immobilisation de l'enzyme avec des argiles ou des oxydes, modèles des minéraux naturels des sols. Ils ont étudié ce phénomène avec la tyrosinase qui joue un rôle important dans la polymérisation de composés phénoliques et la transformation de substances humiques. Le but de cette étude<sup>14</sup> est de comparer l'adsorption de la tyrosinase sur l'argile modifiée avec différents taux  $\text{Al}(\text{OH})_x$ . Le schéma (Figure 6) résume les différents sites de fixation de ces oligomères sur l'argile. Des petites entités d'hydroxylaluminium sont adsorbées et intercalées entre les feuillets de l'argile provoquant une diminution de la capacité d'échange (103 à 18 cmol/kg). Les espèces d'aluminium chargées positivement neutralisent une large portion de la charge négative de l'argile. Cependant, l'intercalation de piliers  $\text{Al}(\text{OH})_x$  dans la structure de la Montmorillonite crée de la microporosité qui augmente la surface spécifique, favorisant l'accessibilité de  $\text{N}_2$  c'est-à-dire de petites molécules au niveau des cavités interstitielles. La quantité d'enzyme adsorbée est plus importante sur la montmorillonite pure. Par contre, avec le composé  $\text{Al}(\text{OH})_x\text{-Mont}$ , l'augmentation du taux de piliers  $\text{Al}(\text{OH})_x$  favorise la rétention des biomolécules (meilleure surface spécifique). L'immobilisation de la tyrosinase est totalement réversible pour l'argile alors qu'elle est pratiquement irréversible (90 %) à la surface de l'argile modifiée. Par contre il est à noter, que pour des concentrations élevées en enzyme, la tyrosinase

<sup>17</sup> A. Naidja, C.Liu, P.M. Huang, J. of Colloid and Interface Science, 251, 2002, 46-56

s'intercale entre les feuillets de la montmorillonite pure alors que l'adsorption par les argiles de biomolécules à faible concentration entraîne de préférence une immobilisation à la surface ou aux bords de la matrice.

Par ailleurs, l'immobilisation est plus intéressante avec la birnessite puisque les expériences indiquent une très haute affinité avec les biomolécules. La birnessite présente une capacité d'adsorption élevée, calculée d'après le modèle de Langmuir, de 9,620 g/g comparée à 0,390 – 0,429 g/g pour les complexes  $\text{Al}(\text{OH})_x$ -Mont. La surface spécifique plus élevée de l'oxyde de manganèse ( $128\text{m}^2/\text{g}$ ) explique cette meilleure immobilisation. Les molécules d'enzymes sont fortement retenues à la surface d'oxyde minéral par des réactions d'échange ou de complexation dans lesquelles les groupements carboxylates de la protéine remplacent respectivement les groupements  $\text{OH}^-$  ou les molécules d'eau des oxydes hydratés.

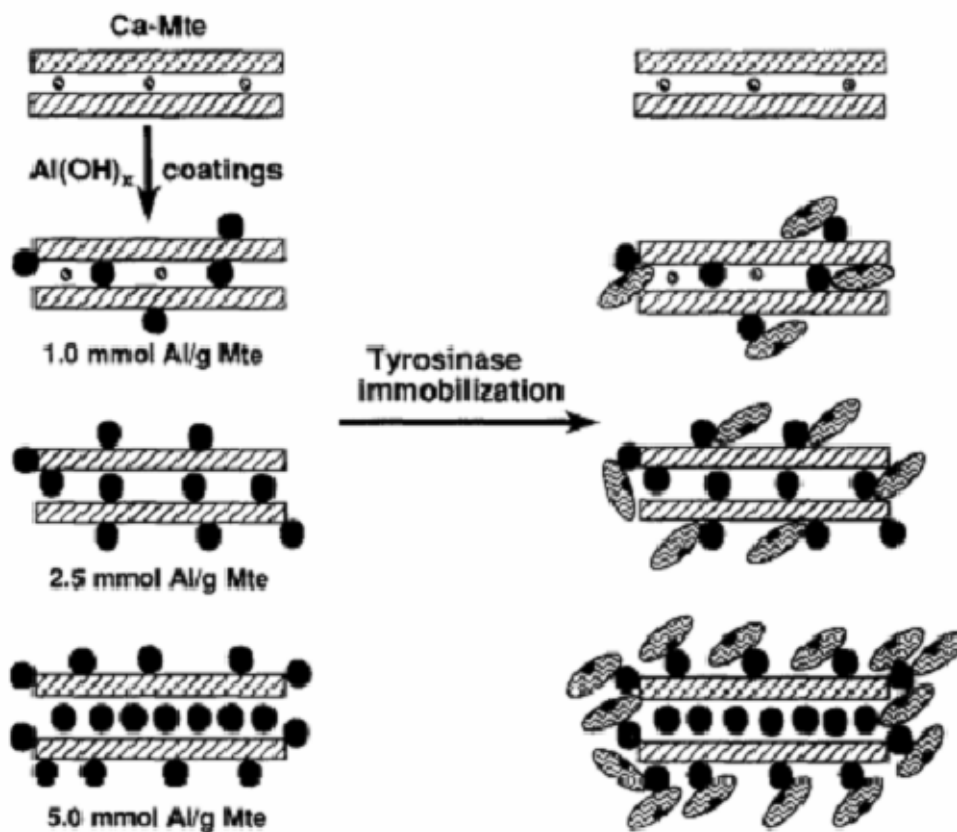
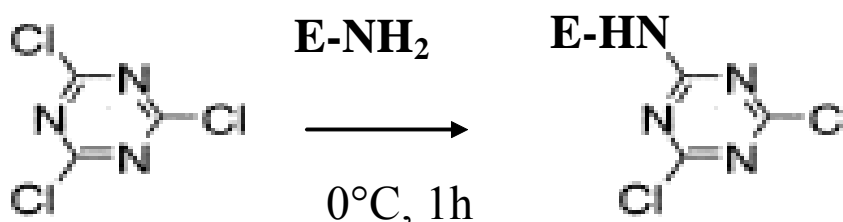


Figure 6 : Modification de la Montmorillonite par des oligomères d'hydroxylaluminium et sites d'adsorption de la tyrosinase<sup>14</sup>

### II.2.2.2 Immobilisation par couplage covalent

La réversibilité du processus d'adsorption, dû à la nature même de l'équilibre adsorption-désorption, conduit à la perte d'une fraction d'enzyme au cours des utilisations successives. Ce relargage est une limite majeure de cette méthode de rétention. Pour éviter ce phénomène, les enzymes peuvent être immobilisées sur la matrice de façon irréversible par liaisons covalentes. Le couplage covalent est basé sur la formation de liaisons fortes entre les molécules d'enzymes et la matrice. La condensation se fait entre les groupements fonctionnels réactifs (-NH<sub>2</sub>, -OH, -SH, -CO<sub>2</sub>H) des acides aminés tels que la lysine, l'histidine, la tyrosine, le glutamate ou l'aspartate et ceux des surfaces d'immobilisation modifiées à cet effet. Cependant, l'immobilisation ne doit pas impliquer de liaisons covalentes avec les acides aminés essentiels à l'activité enzymatique. Une des solutions trouvées, pour minimiser ce problème, est d'immobiliser l'enzyme en présence du substrat.

L'immobilisation<sup>18</sup> de l'invertase sur la bentonite est possible grâce à l'utilisation d'un agent de fixation, le chlorure de cyanuryle (tri-chloro-2,4,6-triazine-1,3,5). La condensation procède selon le schéma suivant :



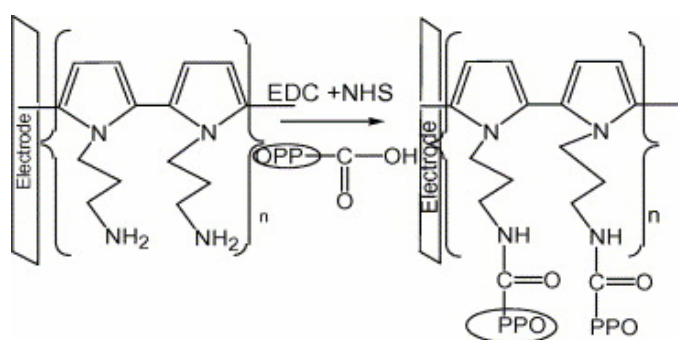
La comparaison du taux d'immobilisation pour ces deux méthodes, greffage covalent et adsorption physique, a pu être réalisée grâce aux mesures d'activité enzymatique. L'activité catalytique de l'enzyme adsorbée est d'environ 60% contre 14 % pour l'enzyme chimisorbée par rapport à celle de l'enzyme libre. La quantité d'enzymes immobilisées par adsorption est par conséquent plus importante. Par contre, la fixation par couplage covalent permet de minimiser le relargage de l'enzyme. Les mesures d'activité effectuées sur l'enzyme fixée par couplage covalent montre que l'enzyme est faiblement relarguée puisque les eaux de lavages ont une activité enzymatique plus faible (5,4) comparée à celle mesurée après adsorption (55,7%). Après les différents lavages (eau et soude), l'enzyme fixée irréversiblement montre une meilleure activité. Cependant, l'immobilisation puis les rinçages entraînent une forte dénaturation de l'enzyme. La lipase pourrait partiellement se fixer, par des sites actifs, les rendant inactifs.

<sup>18</sup> P. Monsan, G. Durand, FEBS Letters, 16 (1), 1971, 39-42

Ce mode de fixation a conduit à une stabilité accrue de l'enzyme vis-à-vis des différents facteurs de dénaturation. En effet, en comparant avec un matériau obtenu par adsorption directe sur la bentonite, la méthode de couplage covalent engendre des performances appréciables vis-à-vis de la température et du vieillissement puisqu'après 2 mois de conservation dans une solution tampon acétate (0,2 M, pH=5,2) à 20 °C, l'enzyme fixée par couplage covalent conserve 70% de son activité initiale, alors que l'enzyme adsorbée a perdu 70% de celle-ci.

L'immobilisation d'enzymes par ce mode de préparation peut être adaptée à une grande diversité de matrices et d'agents de fixation, en particulier pour le développement de biocapteurs.

La tyrosinase (PPO) <sup>19</sup> a été immobilisée sur un film de polymère par liaisons covalentes entre l'enzyme et un polymère conducteur, le poly-(3-aminopropyl pyrrole) pour élaborer un biocapteur à phénol, molécule toxique pour l'environnement. La liaison se crée par couplage peptidique entre les groupements amines libres présents à la surface du polymère et les groupes acides carboxyliques de l'enzyme (Figure 7), pendant une heure dans une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH=7,2). Ces résultats montrent que le polymère peut être une plate-forme d'immobilisation dans le but d'élaborer des électrodes modifiées pour biocapteurs. De plus, le coût faible et la simplicité de la méthode d'immobilisation montrent des avantages complémentaires à ce type d'utilisation.

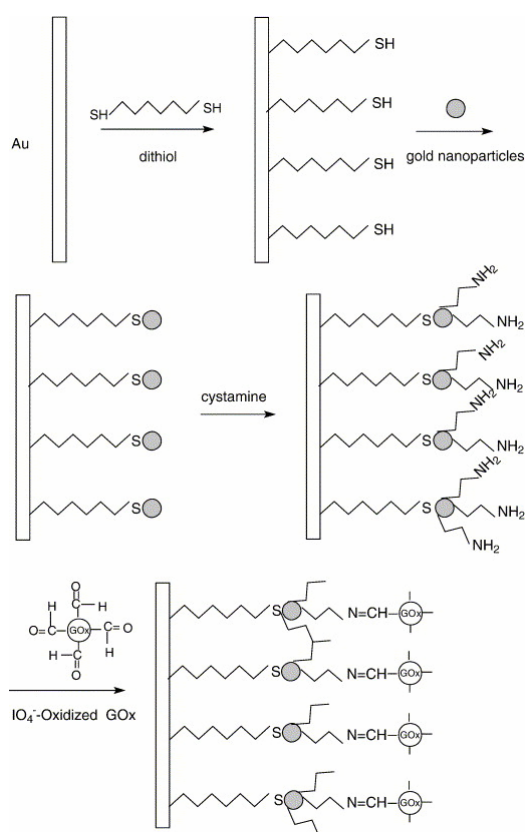


**Figure 7 : Etapes impliquées dans la formation du biocapteur<sup>19</sup>**

La stabilité de l'électrode a été étudiée à différentes températures (4°C et 25 °C). A basse température, 80 % de l'enzyme a été retenu pendant trois mois, par contre à température ambiante l'enzyme immobilisée a perdu 70 % de son activité après deux semaines de stockage.

<sup>19</sup> Rajesh, K. Kaneto, Current Applied Physics, 5, 2005, 178-183

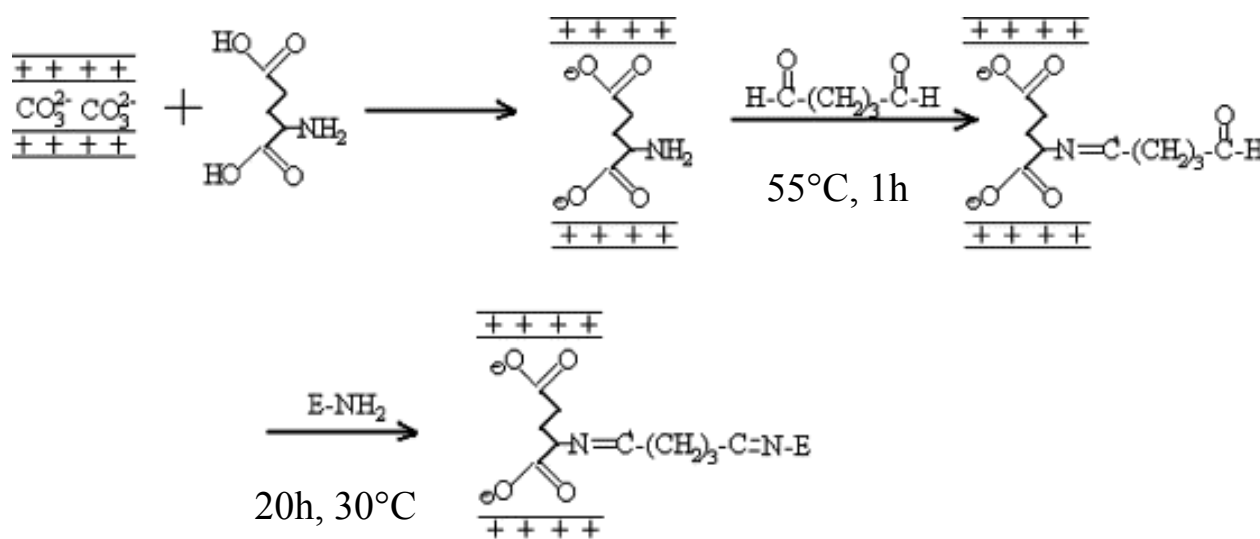
Des biocapteurs à glucose<sup>20</sup> ont été élaborés par auto-assemblage de particules d'or sur une électrode d'or modifiée par des groupements  $\alpha,\omega$ -dithiol (Figure 8). Les particules d'or forment une monocouche greffée aux groupements thiols. Les particules d'or sont ensuite saturées en surface par réaction avec la cystamine afin de les modifier par des groupements amines libres. Ces groupements vont, par la suite, réagir, suivant la réaction de Schiff, avec les groupements aldéhydes de l'enzyme modifiée dans une solution phosphate (0,1 M, pH = 6,8) pendant 1 heure à 4°C. La Figure 8 montre les différentes étapes de l'élaboration de ce biocapteur. D'autres part, les études électrochimiques du biocapteur ont montré les nombreux avantages d'une telle technique d'immobilisation, une forte sensibilité, une faible limite de détection, une bonne reproductibilité et une meilleure stabilité au stockage (pendant 30 jours la réponse du biocapteur est conservée, après 2 mois 70 % de la réponse est maintenue). Ces performances sont attribuées à la biocompatibilité élevée des nanoparticules d'or et aux effets stabilisants du greffage covalent (Au-dithiol-Au-Cystamine-Enzyme).



**Figure 8 : Les différents étapes de greffage de la glucose oxydase avec un support en or<sup>20</sup>**

<sup>20</sup> S. Zhang, N. Wang, H. Yu, Y. Niu, C. Sun, Bioelectrochemistry, 67, 2005, 15-22

Les Hydroxydes Doubles Lamellaires ont aussi été utilisés pour l'immobilisation par couplage covalent d'une enzyme, la penicilline G acylase<sup>21</sup>. La méthode consiste à intercaler du glutamate entre les feuillets d'une phase HDL  $[\text{Mg}_3\text{-Al-NO}_3]$ . Ces anions, associés par interactions électrostatiques aux feuillets de charge positive, assurent la compensation de charge. La seconde étape repose sur la réaction entre le glutamate intercalé et le glutaraldéhyde. Cette réaction conduit à l'expansion des domaines interlamellaires du matériau inorganique. L'immobilisation de l'enzyme est alors permise par liaisons covalentes entre le groupement aldéhyde de l'extenseur (Glutamate-Glutaraldéhyde) et les fonctions amines de l'enzyme (Figure 9). L'analyse thermogravimétrique montre qu'une faible quantité d'enzyme est immobilisée. Malheureusement, cette méthode conduit à une perte substantielle de l'activité enzymatique (40,6% par rapport à l'enzyme libre). Par contre, ce procédé d'immobilisation favorise une meilleure stabilité thermique, et chimique (résistance aux acides) de l'enzyme. En effet, l'activité enzymatique de l'enzyme libre montre une diminution à partir de 50 °C mais pour l'enzyme immobilisée, aucune diminution n'est apparue à cette température. De plus, il a été montré que l'effet tampon de la matrice inorganique basique empêche la dénaturation de l'enzyme immobilisée lors de son utilisation à des pH acides.



**Figure 9 : Schéma d'illustration concernant l'immobilisation de la PGA sur un hydroxyde double lamellaire intercalé par le couple glutamate/glutaraldéhyde**

<sup>21</sup> L. Ren, J. He, S. Zhang, D.G. Evans, X. Duan, J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 18,2002, 3-11,



### II.2.2.3 Immobilisation par encapsulation

Les techniques d'immobilisation tels que l'adsorption et le couplage covalent semblent donc entraîner de manière générale des modifications chimiques qui altèrent les propriétés catalytiques de l'enzyme immobilisée. Cela implique donc d'augmenter la quantité de biomolécules confinées pour récupérer une activité biologique suffisante. L'encapsulation semble pouvoir minimiser ce problème. Cette technique consiste à emprisonner les enzymes dans un matériau perméable et flexible qui les isole partiellement du milieu extérieur et les protège. Le catalyseur peut être confiné dans un gel de polymère ou à l'intérieur d'une capsule.

Avec l'essor de la méthode de préparation par voie Sol-Gel, la recherche<sup>22</sup> de nouveaux matériaux bio-inorganiques s'est orientée sur l'encapsulation de biomolécules telles que les enzymes<sup>24</sup>, les cellules<sup>23</sup>, les bactéries<sup>25</sup> à l'intérieur de gel de silice. Les avantages de cette méthode d'immobilisation dans les matériaux préparés par voie sol-gel sont multiples. Ils permettent de préparer, par exemple, des matériaux optiquement transparents, ou des matériaux multifonctionnels par co-inclusion de diverses composantes chimiques comme des polymères conducteurs ou des modificateurs redox, et par conséquent de jouer sur les propriétés du matériau pour diversifier les applications.

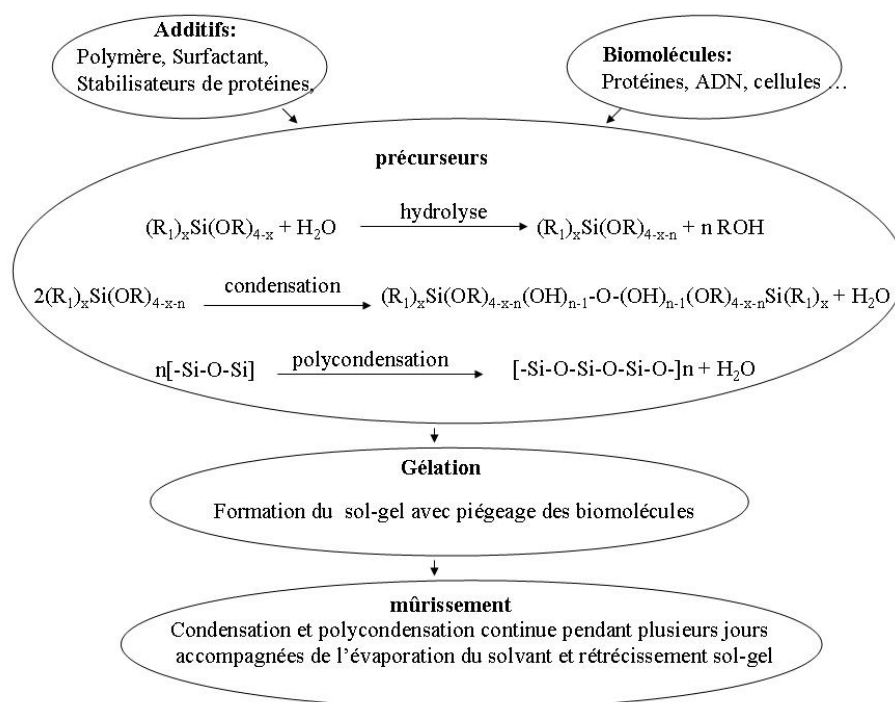
La méthode d'immobilisation par voie Sol-Gel est par définition douce pour les biomolécules. Elle permet la construction du gel autour de ces biomolécules, en respectant les facteurs de forme des macromolécules biologiques et en minimisant les contraintes stériques. Les précurseurs moléculaires du gel peuvent s'adsorber et polymériser à la surface des biomolécules pour former un réseau inorganique, organique ou hybride autour de celles-ci. La synthèse doit être réalisée dans des conditions chimiques adéquates pour la conservation des propriétés enzymatiques. Cette méthode permet la fabrication reproductible des matériaux bio-inorganiques.

La Figure 10 montre les différentes étapes de cette méthode d'encapsulation.

---

<sup>22</sup> W. Jin, J.D. Brennan, *Analytica Chimica Acta*, 1-36, 2002

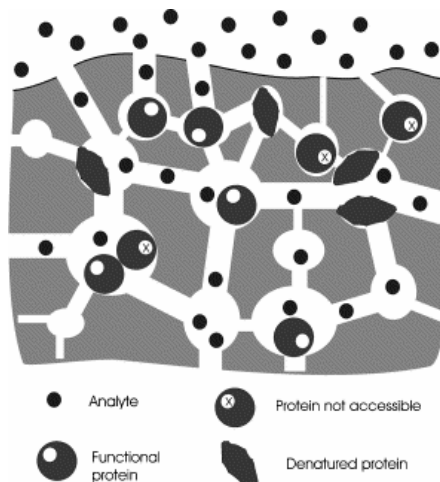
<sup>23</sup> M. F. Desimone, J. De Grossi, M. D'Aquino, E. Luis, *Biotechnology Letters*, 25 (9), 2003, 671-674



**Figure 10 : Immobilisation des enzymes par le procédé sol-gel<sup>22</sup>**

Les tailles des pores doivent être adaptées aux dimensions de la macromolécule et la structure poreuse doit permettre la diffusion de petites molécules comme les substrats à travers la matrice. La taille des pores doit être un compromis entre une taille permettant l'immobilisation de l'enzyme entière et ne permettant pas sa libre circulation et une taille assez grosse pour faciliter la diffusion du substrat. Cependant, le séchage du gel reste une étape critique dans la fabrication de dispositifs de biodétection. Il peut entraîner des cassures bloquant l'accessibilité de l'analyte. Les interactions entre les différentes composantes peuvent aussi entraîner une dénaturation partielle de l'enzyme.

La Figure 11 schématise l'immobilisation des macromolécules dans une matrice Sol-Gel et la diffusion du substrat vers le site actif de la protéine.



**Figure 11 : Schéma représentant l'immobilisation d'enzymes par piégeage dans des matrices de type Sol-Gel<sup>22</sup>**

Les propriétés enzymatiques des enzymes fixées par encapsulation semblent être préservées dans la plupart des cas.

La lipase<sup>24</sup> a été piégée dans une matrice hybride Sol-Gel organique-inorganique préparée par polymérisation du tétraméthoxysilane ( $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ ) avec de l'alkyltriméthoxysilane ( $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ ). Les conditions optimales de préparation ont été déterminées afin d'obtenir la meilleure dispersion des enzymes. Les interactions lipophiles entre les domaines hydrophobes de l'enzyme et les groupements alkyls fonctionnalisés dans le gel ( $\text{RSi}(\text{O}^-)_3$ ) jouent un rôle clé pour une fixation de la biomolécule dans une conformation plus active. Pour comparaison, la lipase libre a été lyophilisée à partir d'une solution tampon (0,1M) à pH= 7,2 et conservée à  $-20^\circ\text{C}$ . Le pourcentage de protéine immobilisée est de 95% et l'activité spécifique résultante de la lipase est 59 fois plus importante que celle de la lipase lyophilisée et non immobilisée. L'enzyme immobilisée montre une stabilité envers la température et le stockage par rapport à l'enzyme libre.

Livage et coll<sup>25</sup> ont montré la faisabilité d'encapsuler une bactérie dans un gel de silice élaboré par voie sol-gel (Figure 12). Ces travaux ont révélé le maintien de l'intégrité cellulaire dans un gel humide et l'amélioration de l'activité enzymatique due à une dispersion de la bactérie dans la matrice. Cependant, le séchage du gel entraîne une perte de l'activité enzymatique.



**Figure 12 : Bactérie piégée dans un gel humide<sup>25</sup>**

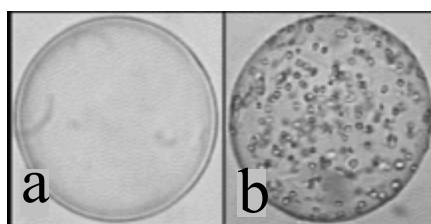
L'immobilisation peut aussi être réalisée dans des capsules sphériques de matériaux dont les tailles du nanomètre au micromètre peuvent être ajustées selon la dimension des biomolécules à immobiliser. La biomolécule peut être confinée, par exemple, dans des billes d'alginate, des

<sup>24</sup> J.P. Chen, W.S. Lin, Enzyme and Microbial Technology, 32, 2003, 801-811

<sup>25</sup> S. Fennouh, S. Guyon, C. Jourdat, J. Livage, C. Roux, Compte Rendu de l'Académie des Sciences, t. 2, série IIC, 1999, 625-630

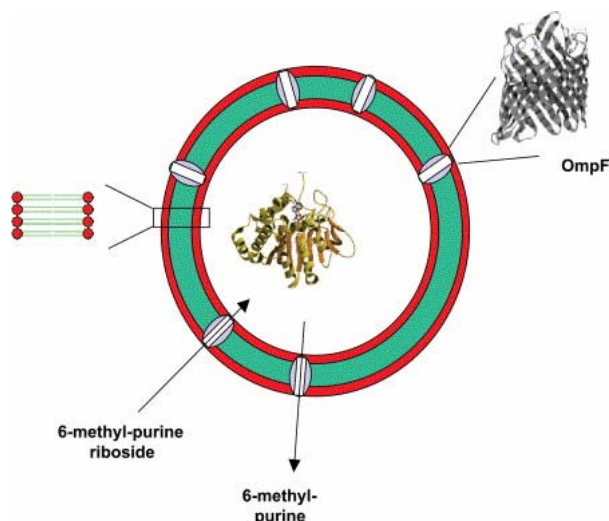
liposomes, des particules d'or. La préparation de ces matériaux est très ciblée, elle s'oriente principalement vers la recherche médicale pour le relargage contrôlé de molécules thérapeutiquement actives dans des cellules cibles.

La microscopie électronique à transmission permet de vérifier l'efficacité du piégeage des enzymes ou des cellules à l'intérieur des capsules. Comme par exemple, dans le cas d'immobilisation de cellules Myoblaste C2C12 dans une microcapsule d'alginate<sup>26</sup> (Figure 13).



**Figure 13 : Capsule a) sans et a) avec cellules<sup>26</sup>**

Les liposomes, minuscules vésicules biologiques, sont utilisés comme transporteurs (vecteurs) d'enzymes. Ces dernières peuvent activer des précurseurs de médicaments. Les travaux de Huysmans et coll<sup>27</sup> ont montré la possibilité d'encapsuler dans des liposomes fonctionnalisés la nucléoside hydrolase, enzyme active dans les thérapies anticancéreuses. La modification de la membrane permet une bonne perméabilité et une meilleure diffusion du précurseur médicamenteux puis du médicament lui-même et par conséquent une meilleure activité enzymatique. La Figure 14 montre l'encapsulation de l'enzyme dans le liposome et la diffusion du substrat.



**Figure 14 : Mécanismes de diffusion du substrat et du produit lors de l'encapsulation d'enzyme dans un liposome fonctionnalisé**

<sup>26</sup> G. Orive, R. M Hernandez, A.R. Gascon, M. Igartua, J. P. Pedraz, International Journal of Pharmaceutics, 259, 2003 57-68

<sup>27</sup> G. Huysmans, A. Ranquin, L. Wyuns, J. Steyaert, P. Van Gelder, J. Controlled Release, 102, 2005, 171-179

Le dernier exemple<sup>28</sup> concerne l'immobilisation de la horseradish peroxydase (HRP) dans des particules d'or creuses. La méthode de préparation implique i) la formation de micelles inverses encapsulant l'HRP, ii) la croissance de particules d'or à la surface des micelles puis iii) la solubilisation des micelles organiques laissant les nanoparticules d'or creuses à l'intérieur desquelles se trouve l'enzyme. La Figure 15 montre le schéma réactionnel de ce type de synthèse. La diffusion des petites molécules de substrat à travers les pores des particules d'or est effective. L'enzyme reste chimiquement active permettant les réactions catalytiques.

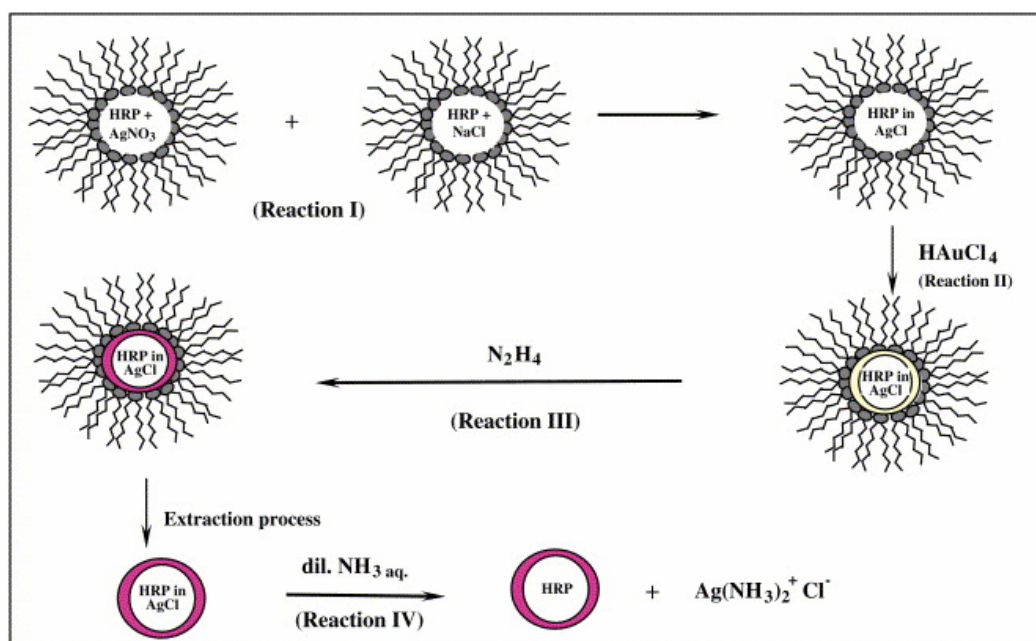


Figure 15: Encapsulation d'enzyme dans une particule d'or creuse<sup>28</sup>

#### II.2.2.4 Immobilisation par nanostructuration de films moléculaires

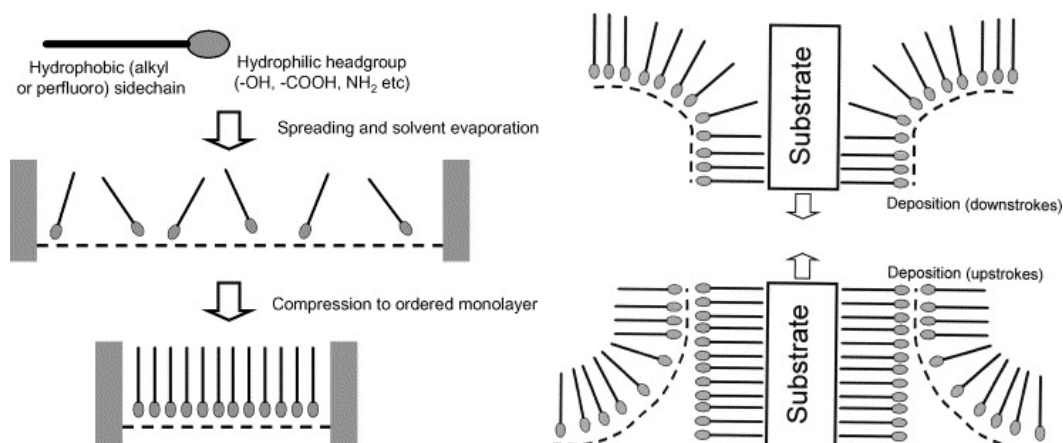
La préparation de films nanostructurés, ordonnés d'enzymes à la surface d'électrodes a permis un développement considérable des biocapteurs à enzymes. Des protéines ont pu être immobilisées par différentes techniques telles que la technique Langmuir-Blodgett (LB), l'auto assemblage et la technique couche-par-couche (CPC ou LBL). La plupart des exemples rapportés concernent l'immobilisation de la glucose oxydase (GOD) suivant ces différentes préparations de films.

La technique de Langmuir Blodgett<sup>29</sup> consiste à déposer, à la surface d'une solution aqueuse, une quantité de molécules amphiphiles qui vont former un film monomoléculaire à l'interface air/eau. Au fur et à mesure que la monocouche est comprimée, elle se densifie pour former un film compact. Si un support plan est plongé et retiré dans la solution, le film va pouvoir être transféré à

<sup>28</sup> R. Kumar, A. N. Maitra, P. K. Patanjali, P. Sharma, Biomaterials, article in press

<sup>29</sup> F. Davis, S. P.J. Higson, Biosensors and Bioelectronics, 21, 2005, 1-20

la surface par des interactions hydrophobes ou hydrophiles, comme le montre la Figure 16. L'immobilisation d'enzymes à la surface d'un support consiste à rajouter dans la solution aqueuse la biomolécule qui va interagir avec la tête polaire de l'amphiphile par des interactions électrostatiques. Il se forme un film hybride amphiphile/enzyme qui sera par la suite déposé sur le substrat par trempage.

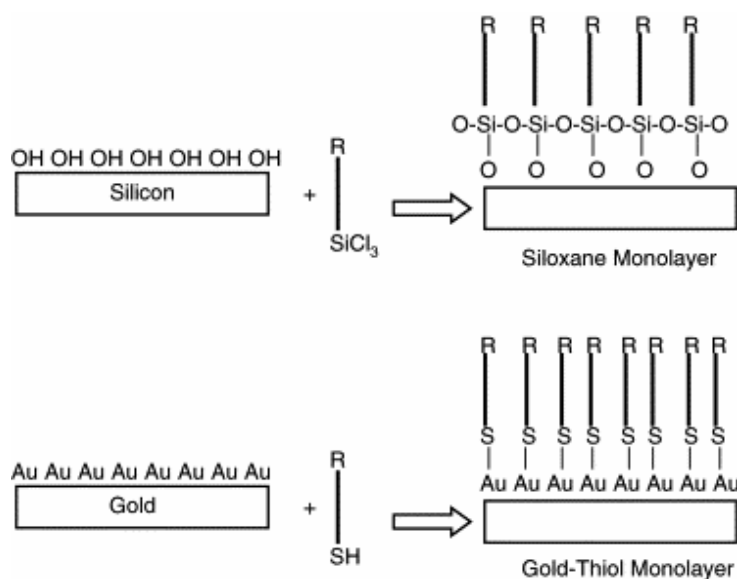


**Figure 16 : Technique Langmuir Blodgett<sup>29</sup> : formation d'un film et transfert sur un substrat**

Des films de GOD<sup>30</sup> ont été préparés par la méthode LB par adsorption sur une monocouche de lipide (N,N-diméthyl,N-cétylacétyl, bromure de methacryléthylammonium) et ensuite transférés sur une surface de platine. L'enzyme maintient son activité après dépôt.

La technique d'auto-assemblage consiste à former une monocouche de molécules organiques par chimisorption sur la surface d'un substrat. Le substrat est traité de manière à avoir des groupements qui interagiront avec la molécule organique. Par exemple, la surface de silicium recouvert par des groupements hydroxyles pourra réagir avec un chlorosilane possédant une longue chaîne alkyle pour former une monocouche de polysiloxane. La Figure 17 montre la préparation de films de molécules organiques par auto-assemblage sur différents substrats.

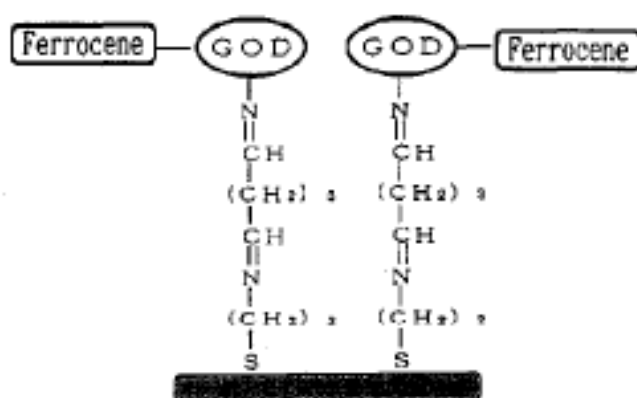
<sup>30</sup> S.Y. Zaitsev, Sensors and Actuators B, 24-25, 1995, 177-179



**Figure 17 : Technique d'auto-assemblage<sup>29</sup> de chlorosilane à la surface de silicium recouvert de groupements OH**

L'immobilisation de l'enzyme peut se faire par greffage avec la fonction terminale de la chaîne alkyle, comme il a été cité précédemment lors de l'immobilisation par couplage covalent.

La glucose oxydase a été immobilisée<sup>31</sup> sur un substrat en or (Figure 18). Le protocole consiste, dans un premier temps, à modifier la surface par auto-assemblage de la cystamine au niveau des groupements thiol. L'amine terminale de la molécule organique se lie au groupement aldéhyde du glutaraldéhyde. L'enzyme va venir se greffer au niveau de la fonction aldéhyde libre.

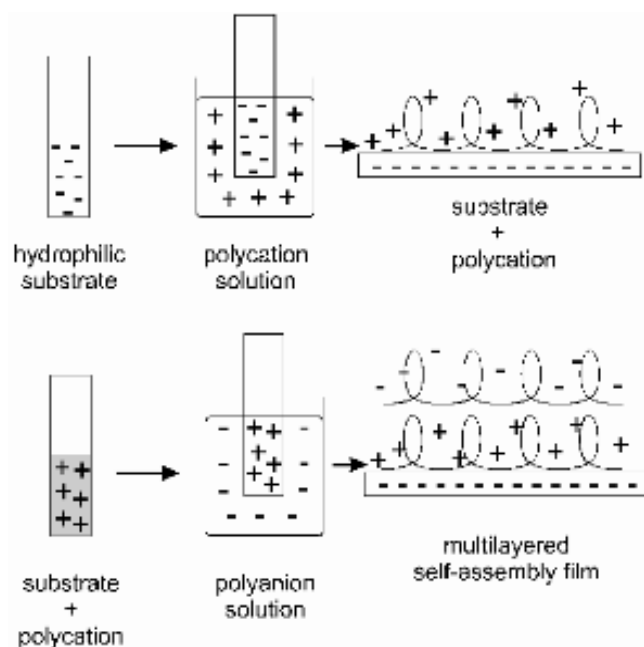


**Figure 18 : Immobilisation de la glucose oxydase par auto-assemblage<sup>31</sup>**

La méthode couche par couche (ou Layer by Layer) est simple et permet de réaliser des assemblages supramoléculaires sur tout substrat chargé. Ces assemblages sont réalisés par

<sup>31</sup> M. Imamura, T. Haruyama, E. Kobatake, Y. Ikariyama, M. Aizawa, Sensors and Actuators B, 24-25, 1995, 113-11

trempages successifs du support alternativement dans une solution de polyanions et de polycations. Le moteur de croissance de ces films, également appelés multicouches de polyélectrolytes, réside dans l'excès de charge qui apparaît après chaque nouveau dépôt d'un polyélectrolyte et qui permet une nouvelle interaction avec le polyélectrolyte de charge opposée (Figure 19).



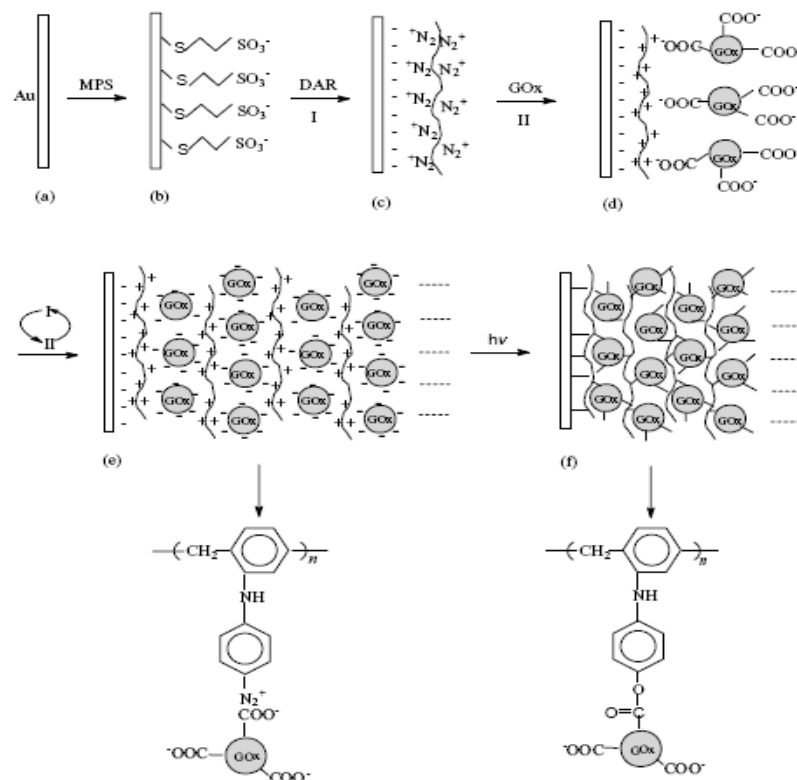
**Figure 19 : Multicouches de polyélectrolytes par la méthode couche par couche<sup>32</sup>**

Les multicouches peuvent être fonctionnalisées en adsorbant des protéines (Figure 20). Des multicouches de films de glucose oxydase<sup>33</sup> sur différents substrats ont été réalisées. La Diazo résine (DAR) comme polycation et la glucose oxydase (GOD) comme polyanion sont déposés alternativement formant alors une structure multicouches par interactions entre le groupement diazonium ( $-N_2^+$ ) du polyélectrolyte cationique et le groupement carboxylate ( $-COO^-$ ) de l'enzyme dont la charge nette est négative dans les conditions de synthèse utilisées. Pour améliorer la stabilité du film, la liaison ionique a été convertie en liaison covalente par irradiation photochimique.

<sup>32</sup> C.E. Borato, P.S.P. Herrmann, L.A. Colnago, O.N. Oliviera. Jr, L.H.C. Mattaso, Braz. J. Chem. Eng. vol. 14 no. 4 São Paulo Dec. 1997

<sup>33</sup> S. Zhang, Y. Niu, C. Sun, Electrochimica Acta 49, 2004, 4777-4786





**Figure 20 : Immobilisation de la glucose oxydase couches par couches**

Pour résumer, il est possible d'obtenir une diversité de mise en forme de biomatériaux hybrides adaptés aux applications désirées. Même si l'immobilisation entraîne une diminution de l'activité provoquée par des changements conformationnels de l'enzyme ou par le blocage des sites actifs (matrice ou excès de la biomolécule), les résultats ont montré une stabilité plus importante de l'enzyme vis-à-vis du stockage, de la température, du pH. La grande diversité des résultats empêche toutefois de considérer l'une de ces méthodes d'immobilisation comme la technique de choix présentant les meilleures performances en terme d'immobilisation, de diffusion du substrat vers les sites actifs ou de préservation des propriétés biocatalytiques.

### III *Les Hydroxydes Doubles Lamellaires : nouvelles structures hôtes pour les enzymes*

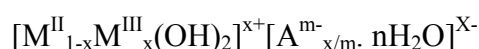
L'implication des Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL) dans des études concernant les molécules d'intérêt biologique est très récente. La plupart des articles datent d'après 1999. Les domaines d'étude concerne l'utilisation de ces matériaux inorganiques pour la stabilisation, le transport, le relargage ou l'élimination de molécules actives telles que des médicaments ou des constituants biologiques (brins d'ADN, protéines). L'intérêt d'un tel développement est justifié par

les propriétés chimiques et structurales très spécifiques de ces composés. C'est pourquoi nous avons choisi de présenter de manière détaillée quelques unes de ces propriétés, fondamentales pour les objectifs de notre étude.

### III.1 Les Hydroxydes Doubles Lamellaires

#### III.1.1 Structure

Les hydroxydes doubles lamellaires (encore dénommés argiles anioniques) sont des minéraux peu abondants à l'état naturel. Leur structure est dérivée de celle de la brucite  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ . Les cations métalliques entourés de six atomes d'oxygène des groupes hydroxyles forment des octaèdres  $\text{M}(\text{OH})_6$ . Ces derniers s'assemblent par leurs arêtes de façon co-planaire et constituent alors un feuillet plan. Dans le cas des HDL, la substitution d'une partie des cations divalents par des cations trivalents génère une charge positive variable du feuillet. Pour compenser cet excès de charge, des anions accompagnés de molécules d'eau s'insèrent entre les feuillets et permettent l'électroneutralité de l'édifice. Dans le cas d'une composition à deux cations (divalent et trivalent), ces composés sont définis par la formule générale :



Par la suite, nous utiliserons la notation abrégée :  $[\text{M}^{\text{II}}_{\text{R}}\text{M}^{\text{III}}\text{-A}]$ , où  $\text{M}^{\text{II}}$  et  $\text{M}^{\text{III}}$  sont les cations divalents et trivalents respectivement, A l'anion intercalé et R le rapport  $\text{M}^{\text{II}}/\text{M}^{\text{III}}$ . La Figure 21 schématise la structure de ce matériau.

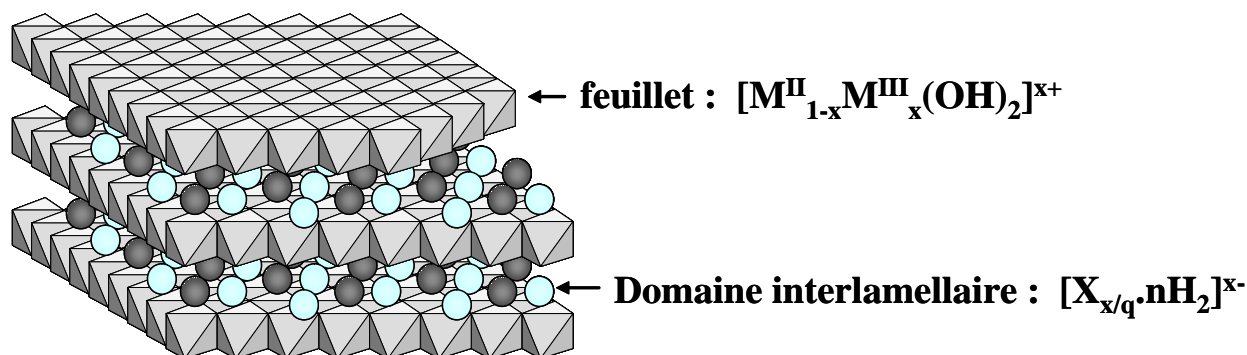


Figure 21 : Représentation schématique des Hydroxydes Doubles Lamellaires

Les composés naturels appartiennent à deux groupes minéralogiques (Hydrotalcite et Manasséite) qui se différencient par leur séquence d'empilement. Le Tableau 3 indique d'autres minéraux naturels de la même famille structurale que l'hydrotalcite ou que la manasséite, mais présentant des différences au niveau de la composition chimique.

**Tableau 3 : Les différentes compositions des groupes hydrotalcite et manasséite**

Composition chimique	Groupe manasséite	Groupe hydrotalcite
$[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}].[\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	Manasséite	Hydrotalcite
$[\text{Mg}_6\text{Cr}_2(\text{OH})_{16}].[\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	Barbertonite	Stichtite
$[\text{Mg}_6\text{Fe}_2(\text{OH})_{14}].[\text{CO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$	Sjogrenite	Pyroaurite
$[\text{Mg}_{10}\text{Fe}_2(\text{OH})_{24}].[\text{CO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$		Coalingite
$[\text{Mg}_6\text{Fe}_{1.3}(\text{OH})_{12}].[\text{Cl}_{1.3} \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$		Iowaite
$[\text{Mg}_6\text{Mn}_2(\text{OH})_{16}].[\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$		Desautelsite
$[\text{Ni}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}].[\text{CO}_3 \cdot \text{OH} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$		Takovite
$[\text{Fe}_6\text{Fe}_2(\text{OH})_{16}].[\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$		Foujerite
$[\text{Mg}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}].[\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	Quintinite-2H	
$[\text{Mg}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}].[\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$	Quintinite-3T	
$[\text{Fe}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}].[\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$	Caresite	
$[\text{Mn}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}].[\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$	Charmarite-2H	
$[\text{Mn}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}].[\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$	Charmarite-3T	
$[\text{Zn}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}].[\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$	Zaccagnaite	

Ces matériaux cristallisent dans un réseau hexagonal suivant deux types d'empilement différents. L'hydrotalcite présente une symétrie rhomboédrique (3R) provoquée par une séquence d'empilement BC-CA-AB-BC. La manasséite montre une symétrie hexagonale (2H) provoquée par la séquence BC-CB-BC. En général, les composés naturels ont plutôt tendance à adopter une symétrie rhomboédrique alors que le polytype hexagonal correspond surtout à la variante haute température. De plus, les matrices synthétiques cristallisent plutôt suivant la symétrie rhomboédrique. Dans ce cas, on a comme paramètres de maille :

$a$  : distance entre deux cations voisins dans le plan du feuillet

$c$  : égal à trois  $d$ , avec  $d$  correspondant à la distance entre deux feuillets adjacents.

Par exemple, l'hydrotalcite naturelle,  $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}].[\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ , possède comme paramètres de mailles  $a = 0,3054 \text{ nm}$ ,  $c = 2,281 \text{ nm}$ , et une distance interlamellaire égale à  $c/3 = 0,763 \text{ nm}$ . Ces

paramètres diffèrent en fonction de la nature de la composition chimique. Le paramètre  $a$  dépend uniquement des tailles des cations divalents et trivalents du feuillet et du taux de substitution. Sa formule est :  $a = \sqrt{2} * ((1-x) r_{\text{MII}} + x r_{\text{MIII}})$ . Le paramètre  $c$ , lié à la distance interlamellaire, est fonction de la taille de l'anion intercalé, de sa charge qui détermine le nombre d'anions intercalés et de son orientation dans l'espace interlamellaire mais aussi de la nature du feuillet.

Le domaine interlamellaire est constitué des anions, compensateurs de charges, et de molécules d'eau. Cette région montre d'une manière générale un fort désordre. En effet, les interactions entre les différentes espèces constituant ce milieu sont des liaisons faibles, de type électrostatique, liaison hydrogène ou de Van der Waals qui favorisent la mobilité des espèces intercalées. Une légère augmentation de la température ou la mise en suspension dans un solvant polaire permettent un écartement des feuillets qui facilite les processus d'intercalation-désintercalation.

Une grande diversité de composés Hydroxydes Doubles Lamellaires peut être synthétisée en faisant varier :

- la composition chimique du feuillet,
- l'anion intercalé.

Grâce à cette variabilité de composition chimique, il est possible d'élaborer des matériaux à propriétés physico-chimiques modulables pour une grande variété d'applications.

La composition chimique du feuillet est représentée par rapport à la formule abrégée  $[M^{\text{II}}_R-M^{\text{III}}]$ . Il est donc possible de jouer sur la nature des cations métalliques, ainsi que sur le taux de substitution, c'est à dire sur le rapport molaire  $M^{\text{II}}/M^{\text{III}}$  ( $R = (1+x)/x$ ). Le Tableau 4 montre les différentes combinaisons que l'on peut rencontrer. Cependant les contraintes structurales impliquent que les rayons ioniques soient dans un domaine de variation compris entre  $70 \pm 4$  pm pour le métal divalent et  $60 \pm 4$  pm pour le métal trivalent.

Tableau 4 : Combinaisons possibles entre cations métalliques pour la constitution du feuillet HDL

H	Layers : $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+}$																He						
Li	Be	$M^{+}$				$M^{2+}$				$M^{3+}$				$M^{4+}$				B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg																	Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr						
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe						
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn						
Fr	Ra	Ac	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu							
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr							

Les rapports  $M^{II}/M^{III}$  sont le plus souvent ajustables. Cependant, certaines matrices d'HDL ne présentent qu'un rapport et il est impossible de les synthétiser avec d'autres taux de substitution. Le Tableau 5 récapitule les différents rapports que peuvent adopter certaines matrices.

Tableau 5 : Rapport molaire  $M^{II}/M^{III}$  des HDL

Matrice	Rapport $M^{II}/M^{III}$ ajustable
[Zn-Al]	$1.0 \leq R \leq 5.0$
[Mg-Al]	$1.0 \leq R \leq 3.0$
[Ni-Al]	$1.0 \leq R \leq 3.0$
[Cu-Al]	$1.0 \leq R \leq 5.0$
[Mg-Fe]	$2.7 \leq R \leq 5.6$
[Zn-Fe]	$2.0 \leq R \leq 4.0$
[Co-Fe]	$1.0 \leq R \leq 4.0$
[Ni-Fe]	$2.0 \leq R \leq 3.0$
Matrice	Rapport $M^{II}/M^{III}$ fixé
[Zn-Cr]	2
[Mg-Cr]	2

A priori, aucune limite structurale n'empêche l'intercalation de tous types d'anions dans la structure HDL et un nombre élevé d'espèces atomiques ou moléculaires peuvent être intercalées sous leur forme anionique. Ajoutons à cela que les molécules polaires neutres peuvent aussi être co-intercalées avec ces anions, étendant le très large domaine de composition dans le domaine interlamellaire.

Typiquement, les familles d'anions concernées sont les suivantes:

- halogénures ( $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ),
- oxo-anions non métalliques ( $BO_3^{3-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $Si_2O_5^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $ClO_4^-$ ,  $AsO_4^{3-}$ ,  $SeO_4^{2-}$ ,  $BrO_4^- \dots$ ),
- anions oxométallates ( $VO_4^{3-}$ ,  $CrO_4^{2-}$ ,  $MnO_4^-$ ,  $V_{10}O_{28}^{6-}$ ,  $Cr_2O_7^{2-}$ ,  $Mo_7O_{24}^{6-}, \dots$ ),
- anions complexes ( $Fe(CN)_6^{2-} \dots$ ),
- anions organiques ( $CH_3COO^-$ ,  $C_6H_5COO^-$ ,  $C_{12}H_{25}COO^-$ ,  $C_2O_4^{2-}$ ,  $C_6H_5SO_3^- \dots$ ),
- polymères anioniques (polyacrylate, polystyrène sulfonate, ...)

### III.1.2 Propriétés d'échange anionique

Les propriétés d'échange anionique des HDL sont liées à la structure bidimensionnelle des HDL et à la nature des interactions faibles entre la charpente lamellaire et l'anion de compensation de charge. Dans la formule ( $M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_{2A_{x/q}.nH_2O}$ ), la quantité d'anions par unité est déterminée par le taux de substitution,  $x$ , du métal divalent par le métal trivalent. La capacité d'échange anionique, *c.e.a.*, dépend de la valeur de  $x$  et peut être définie dans le cas d'un anion monovalent par l'équation suivante :

$$C.E.A. = \frac{x.10^5}{F.W.} \text{ (meq./100g)}$$

Où F.W. est la masse moléculaire et est calculé  $F.W. = (M_{MII} + 46) + (M_{MIII} + M_X - M_{MII}) x$ .

Ce paramètre est calculé en prenant en compte une occupation totale des sites cristallographiques interlamellaires restants (2/3) par les molécules d'eau, soit 0.66  $H_2O/Métal$ .

Comme la capacité d'échange anionique résulte du rapport molaire  $M^{II}/M^{III}$  (R), elle est invariable lorsque R est fixé comme pour  $[Li-Al_2]$ ,  $[Zn_2-Cr]$  et  $[Cu_2-Cr]$ , mais fortement ajustable pour des systèmes  $[M^{II}-M^{III}]$  avec des R modulables tels que  $[Mg_R-Al]$  ou  $[Zn_R-Al]$ .

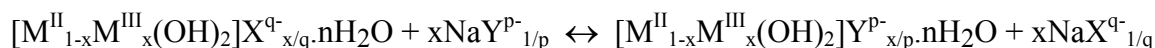
Le Tableau 6 donne les capacités d'échange anionique calculées, la densité de charge électrique par unité de surface de feuillet et la surface de feuillet libre de certaines matrices par unité de charge.

**Tableau 6 : Propriétés d'échange anionique des HDL**

[M <sup>II</sup> -M <sup>III</sup> ]	x	Masse par unité formulaire	CEA (cmol/kg)	a (nm)	Densité de charge (charge/nm <sup>2</sup> )	Surface libre (nm <sup>2</sup> /charge)
[Mg-Al-Cl]	0.20	77.92	256.7	0.3060	2.47	0.405
	0.25	79.83	313.2	0.3054	3.09	0.323
	0.33	82.88	398.2	0.3042	4.24	0.236
[Zn-Al-Cl]	0.20	110.80	180.5	0.309	2.49	0.401
	0.25	110.65	225.9	0.308	3.13	0.319
	0.33	110.41	298.9	0.307	4.16	0.240
[Mg-Al-CO <sub>3</sub> ]	0.33	81.08	407.0	0.3042	4.24	0.236
[Mg-Al-NO <sub>3</sub> ]	0.33	91.64	360.1	0.3042	4.24	0.236
[Li-Al-Cl]	0.33	78.12	422.4	0.3070	4.16	0.240

Les résultats montrent que les capacités *c.e.a.* sont comprises entre 200 et 400 meq/100g. En comparaison avec les argiles cationiques (80 meq/100g pour une bentonite sodique), les HDL présentent des capacités d'échange anionique beaucoup plus importantes et montrent donc une plus grande facilité à intercaler des ions.

Ces propriétés d'échange ont été utilisées pour la préparation de nouvelles phases HDL contenant différents types d'anions. La réaction d'échange anionique peut être décrite de la façon suivante :



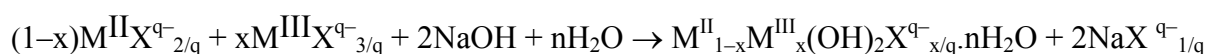
### **III.2 Les HDL : composés à morphologie contrôlée**

#### **III.2.1 Les différentes voies de préparation**

Les matériaux hydroxydes doubles lamellaires sont principalement préparés par chimie douce. Différentes voies de synthèses existent. Le matériau est précipité directement ce qui est le cas lors de la coprécipitation, de l'hydrolyse induite et de la méthode urée. Le matériau désiré est préparé indirectement ce qui est le cas lors de l'échange anionique, la délamination - reconstruction, la calcination – reconstruction. Ces modes de préparation sont plus ou moins adaptés à la composition chimique souhaitée.

La coprécipitation<sup>34</sup> à pH constant:

Les hydroxydes doubles lamellaires sont initialement préparés par coprécipitation. Cette méthode conduit à l'intercalation directe de l'anion désiré au cours de la formation de la charpente inorganique. Dans une solution aqueuse contenant éventuellement les anions à intercaler sont additionnées simultanément une solution mixte de sels métalliques divalents et trivalents et une solution d'agent de précipitation, une base de Broensted (NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Le pH reste constant tout au long de la synthèse pour favoriser l'obtention de phases homogènes. La réaction qui se produit est la suivante :



Le pH de précipitation dépend des propriétés des cations métalliques. Le Tableau 7 récapitule le pH pour obtenir différentes matrices.

**Tableau 7 : pH de formation de certaines matrices HDL**

<b>M<sup>II</sup>-M<sup>III</sup>-X</b>	<b>pH<sub>form.</sub></b>
[Zn <sub>2</sub> -Cr-Cl]	6,5
[Cu-Cr-Cl]	5,5
[Zn <sub>R</sub> -Al-Cl]	7,0-9,0
[Mg <sub>R</sub> -Al-Cl]	9,0-10,0
[Ni <sub>R</sub> -Cr-Cl]	10,0-13,0
[Ca <sub>R</sub> -Al-Cl]	11,0

Pour la phase [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl], un pH inférieur à 7,0 conduit à une précipitation incomplète des ions Zn<sup>2+</sup> et favorise en parallèle la précipitation d'hydroxyde d'aluminium alors qu'un pH supérieur à 9,0 forme de l'hydroxyde voire de l'oxyde de zinc.

Cependant, la coprécipitation des hydroxydes métalliques peut être supplantée par la précipitation de sels thermodynamiquement plus stables ou moins solubles, tels que les chromates, phosphates. Dans ce cas, il est conseillé de passer par la préparation d'un précurseur avant l'intercalation des anions précipitants.

<sup>34</sup> S. Miyata, Clays and Clay Minerals, 31, 23, 369, 1975



La méthode urée :

La méthode urée<sup>35</sup> a été développée pour obtenir une taille de particules monodisperses. Le protocole consiste à utiliser une base retard comme l'urée de façon à contrôler son hydrolyse. A des températures supérieures à 70°C, l'urée se décompose et libère des OH<sup>-</sup> qui vont réagir avec les sels métalliques. Plus la température est élevée et plus la précipitation de la phase HDL sera rapide. Cette méthode permet un contrôle cinétique de la coprécipitation.

L'inconvénient majeur de cette méthode provient de la génération in situ d'anions carbonates très favorable à l'intercalation dans les HDL.

L'adaptation de cette méthode à notre travail de recherche sera présentée et discutée dans le chapitre II.

L'échange anionique :

Comme il a été cité précédemment, les HDL présentent une grande capacité d'échange anionique. De ce fait, il est possible de remplacer l'anion intercalé par un autre.

Cette méthode consiste à mettre en contact l'anion que l'on désire intercaler avec le précurseur HDL. Le milieu réactionnel est agité pendant plusieurs heures sous une atmosphère contrôlée. Pour favoriser l'échange total, le protocole sera modifié en changeant la température, le temps de réaction, la nature du milieu réactionnel. Le choix du précurseur HDL joue un rôle important. Miyata et coll<sup>36</sup> ont établi les séries des affinités décroissantes des anions vis à vis de la matrice HDL : OH<sup>-</sup> > F<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > I<sup>-</sup> pour les anions monovalents et CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> > C<sub>10</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sup>2-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> pour les anions divalents. Plus l'anion a une densité de charge élevée et plus sa stabilité dans le domaine interlamellaire est importante. Il est donc conseillé de travailler avec des précurseurs nitrates ou chlorés sous une atmosphère dépourvue de CO<sub>2</sub> à cause de la forte affinité des HDL pour les carbonates.

---

<sup>35</sup> U. Costantino, F. Marmottini, M. Nocchetti, R. Vivani, European. J. Inorganic. Chemistry , 1439- 1446, 1998

<sup>36</sup> S. Miyata , Clays and Clay Minerals, 103, 170, 1980

### La Calcination – Reconstruction :

Miyata et coll<sup>37</sup> ont été les premiers à décrire la capacité qu'ont les phases HDL de retrouver leur structure originelle après calcination, sous certaines conditions de traitement thermique. Certains ont parlé d'« effet mémoire » de la structure HDL. La méthode consiste à faire subir un traitement thermique au composé inorganique à des températures où l'anion volatile se décompose pour permettre l'obtention d'oxydes métalliques mixtes amorphes. La réhydratation dans une solution aqueuse contenant l'anion invité permet la reconstruction de l'hydroxyde double lamellaire désiré. La décomposition thermique des HDL procède en plusieurs étapes. De manière générale, il y a dans un premier temps déshydratation des molécules d'eau faiblement liées et préservation de la structure lamellaire. Entre 200 et 600°C, l'anion se décompose amenant à la formation d'un oxyde mixte amorphe. Puis à des températures supérieures, des phases bien définies telles que MO ou la phase spinelle  $M^{II}M^{III}_2O_4$  apparaissent. La température de calcination s'avère très importante pour le processus de reconstruction, car il faut éviter d'amorcer la 3<sup>ème</sup> étape de décomposition irréversible.

Une étude sur le comportement de  $[Zn_R-Al-Cl]^{38}$  a montré que la reconstruction du matériau dépendait de la température de reconstruction et du rapport molaire Zn/Al. L'oxyde ZnO se forme dès 300 °C. Au fur et à mesure que la température de calcination augmente, la phase cristallise. A partir de 700°C, la phase spinelle  $ZnAl_2O_4$  co-existe avec l'oxyde. La reconstruction est favorisée à des températures proches de 300°C c'est-à-dire dans le cas où les phases sont amorphes. Dès l'apparition de phases bien cristallisées, la reconstruction devient difficile.

Le deuxième facteur influençant la régénération de la phase HDL est le rapport molaire. Dans le cas où  $R=1$ , l'hydroxyde d'aluminium est majoritaire, alors que pour  $R=4$  ou  $5$ , l'oxyde de zinc se forme. Ces résultats suggèrent d'utiliser cette méthode pour des rapports compris entre 2 et 3.

### La Délamination - Réempilement

En 2000, notre laboratoire a mis au point un protocole concernant l'exfoliation<sup>39</sup> des plaquettes d'hydroxydes doubles lamellaires et la possibilité de reconstruire le matériau inorganique par réempilement des plaquettes délaminiées. Dans un premier temps, il est nécessaire de diminuer les

<sup>37</sup> S. Miyata, Clays and Clay Minerals, 23, 1975, 369-375

<sup>38</sup> F. Kooli, C. Depège, A. Ennaqadi, A. De Roy, J.P. Besse, Clays and Clay Minerals, 45, n°1, 1977, 92-98

<sup>39</sup> F. Leroux, M. Adachi-Pagano, M. Intissar, S. Chauvière, C. Forano, J.P. Besse, J. Materials Chemistry, 11, 2001, 105-112, 2001

forces attractives qui existent entre les deux feuillet. De ce fait, un anion surfactant tel que le dodécylsulfate a été intercalé dans un HDL. Le matériau hybride est ensuite mis en suspension dans un solvant polaire tel que le butanol. Le milieu réactionnel est mis à reflux pour permettre la délamination. Une solution colloïdale stable est ainsi obtenue. Le matériau inorganique de départ est reconstruit par transfert de phase dans une solution aqueuse contenant l'anion que l'on désire intercaler.

O'hare et coll<sup>40</sup> ont montré que la délamination de la phase HDL/DDS pouvait se produire dans un solvant organique polaire tel que le monomère d'acrylate. La phase hybride est incorporée dans le milieu organique. La température est augmentée jusqu'à 70°C et le mélange réactionnel subit un cisaillement pour favoriser la délamination.

Une autre étude<sup>41</sup> a montré la possibilité d'exfolier les hydroxydes doubles lamellaires en utilisant le couple acide aminé/solvant polaire à température ambiante. L'interaction attractive entre l'acide aminé et les molécules du solvant vont permettre une pénétration d'un volume important du solvant et provoquer la délamination. Les résultats optimums ont été obtenus en utilisant l'association glycine/formamide. Le matériau HDL/glycine est directement mis dans une solution de formamide. Au bout de quelques minutes, la solution devient colloïdale.

Ces différentes méthodes présentent un inconvénient puisqu'elles permettent seulement de délaminer une faible quantité d'HDL dans un grand volume de solvant (1,5 g/L de butanol pour la phase [Zn-Al-DDS], 3,5 g/L de formamide pour la phase HDL/glycine)

### *III.2.2 Effet des différentes méthodes de synthèse sur la morphologie des phases HDL*

La morphologie des particules d'hydroxydes doubles lamellaires dépend évidemment de la méthode de préparation. Lors de la coprécipitation standard, le recouvrement des étapes de nucléation et de croissance entraîne une précipitation hétérogène. Il s'ensuit la formation de petites particules hexagonales agrégées en cristallites secondaires de formes variées (rose des sables, château de cartes). Dans le cas où ces étapes sont bien séparées (méthode urée) la formation de grosses plaquettes de forme hexagonale est obtenue<sup>42</sup>.

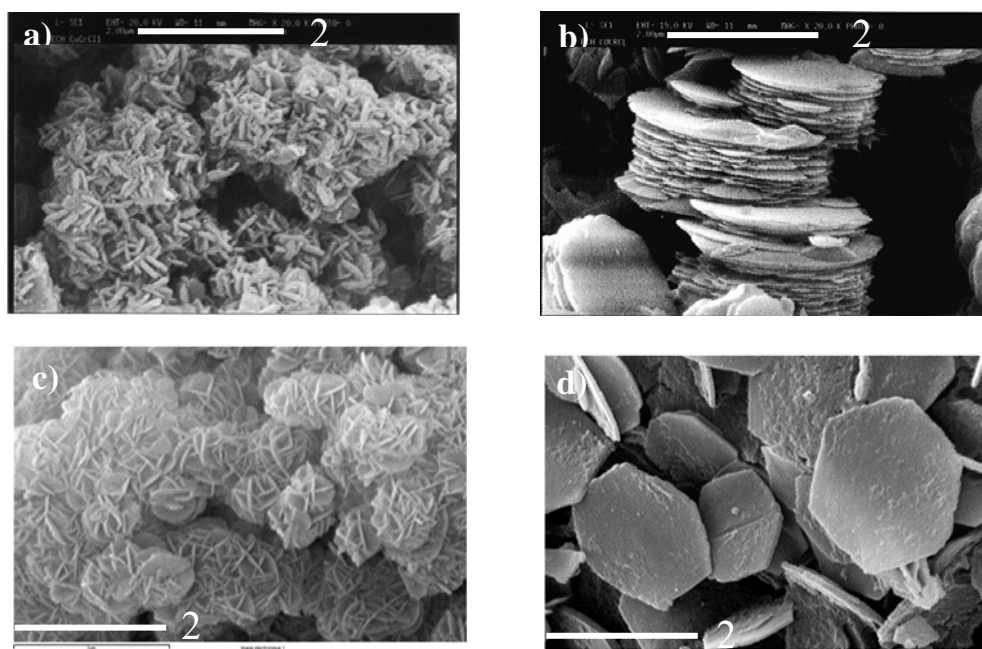
<sup>40</sup> S. O'Leary, D. O'Hare, G. Seeley, Chemical Communication, 2002, 1506-1507

<sup>41</sup> T. Hibino, W. Jones, J. Material Chemistry, 11, 2001, 1321-1323

<sup>42</sup> U. Costantino, F. Marmottini, M. Nocchetti, R. Vivani, European. J. Inorganic Chemistry, 1998, 1439-1446

Les conditions de contrôle du pH au cours de la précipitation ont aussi un effet important sur les propriétés texturales des HDL et en particulier sur les propriétés de porosité. Par exemple, la coprécipitation à pH croissant de la phase  $[\text{Mg}_2\text{-Al-CO}_3]$ <sup>43</sup> provoque la précipitation de petites plaquettes de forme mal définie, rugueuses mais avec une surface spécifique élevée. Au contraire, les particules préparées à pH constant sont idéalement hexagonales, bien définies, lisses et plus grosses. La première méthode engendre une distribution de pores entre 80 et 250 Å alors que la seconde conduit à une distribution d'un rayon proche de 20 Å.

Les propriétés texturales dépendent aussi de la composition chimique des feuillettes. En effet, alors qu'une phase  $[\text{Mg}_2\text{-Al-CO}_3]$  préparée par coprécipitation a tendance à montrer une morphologie de rose des sables, la phase  $[\text{Cu}_2\text{-Cr-Cl}]$  montre un empilement en forme de château de cartes des plaquettes HDL (Figure 22). Une étude a été réalisée<sup>44</sup> sur l'effet de la substitution partielle du fer et du cuivre dans une phase  $[\text{Mg-Al-CO}_3]$ . Les produits substitués montrent une conservation de la structure lamellaire mais la morphologie subit des modifications importantes. La présence de cuivre entraîne une augmentation de taille des pores tandis que le fer diminue leur taille par rapport à la phase non-substituée. Par conséquent, la surface spécifique est modifiée et progresse de la façon suivante :  $\text{Cu-HDL} < \text{Mg-HDL} < \text{Fe-HDL}$ . Ce changement serait provoqué par le type d'interconnexions et d'agglomérations des particules.



**Figure 22 : Microscopie électronique de  $[\text{Cu}_2\text{-Cr-Cl}]$  préparé par a)  $\text{CuO/CrCl}_3$  hydrolyse induite et b) coprécipitation (V. Prevot, résultats non publiés) et  $[\text{Mg}_2\text{-Al-CO}_3]$  préparé par c) coprécipitation et d) la méthode urée.**

<sup>43</sup> S.K. Yun, T. J. Innavaia, Chem Mater, 7, 1995, 348-354

<sup>44</sup> G. Carja, R. Nakamura, T. Aida, H. Niiyama, Microporous and Mesoporous Materials, 47, 2001, 275-284

L'anion intercalé joue un rôle sur la morphologie des hydroxydes doubles lamellaires. L'intercalation du polyoxyéthylène sulfate par échange anionique ou l'adsorption de polyéthylène glycol à la surface ont montré une modification<sup>45</sup> des particules qui passent d'une forme hexagonale bien définie à une forme sphérique montrant l'impact déterminant du milieu microstructuré dans lequel précipite le minéral. L'intercalation d'acides aminés<sup>46</sup> tels que l'aspartate et le glutamate dans des phases [Mg-Al], révèle des différences significatives sur l'aspect structural et textural du matériau. L'anion intercalé peut influencer la croissance cristalline, l'aggrégation du matériau hybride. Lors de l'intercalation d'aspartate, la microscopie électronique à transmission révèle la disparition de plaquettes bien définies et plus ou moins individuelles (Figure 23). Il apparaît des agrégats irréguliers formés de plaquettes non uniformes. Cependant, si on augmente l'agrandissement, le matériau semble beaucoup plus ordonné. On distingue des franges caractéristiques de l'empilement des feuillets.

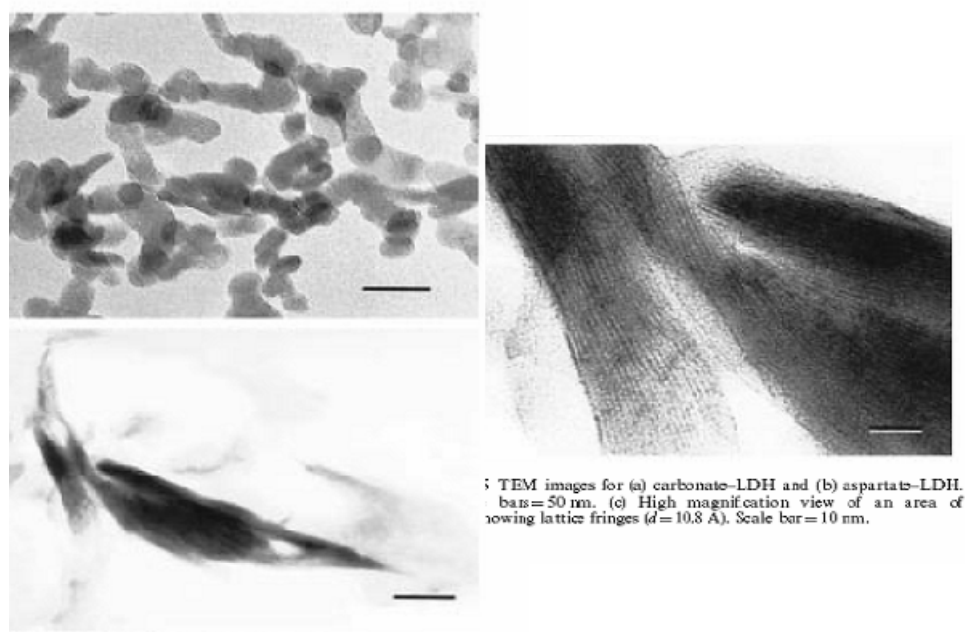


Figure 23 : Microscopie à transmission des phases [Mg<sub>2</sub>-Al-CO<sub>3</sub>] et [Mg<sub>2</sub>-Al-Aspartate]<sup>46</sup>

### III.3 Les HDL : structures hôtes pour les biomolécules

Les matériaux bio-inorganiques doivent répondre à un cahier des charges sévère imposant en particulier une densité élevée de molécules actives immobilisées dans la matrice inorganique, une bonne accessibilité du substrat, la conservation de l'activité biologique, une stabilité opérationnelle

<sup>45</sup> Q.Z. Yang, D. J. Sun, C. G. Zhang, X.J. Wang, W.A. Zhao, Langmuir, 19, 2003, 5570-5574

<sup>46</sup> N.T. Whilton, P.J. Vickers, S. Mann, J of Materials Chemistry, 7 (8), 1997, 1623-1629

et une stabilité au stockage. Leur élaboration doit faire appel à des procédés de chimie douce afin d'éviter la dénaturation de la biomolécule.

Les hydroxydes doubles lamellaires présentent des propriétés adaptées à l'immobilisation de molécules biologiques ou d'intérêt biologique (par exemple : les médicaments). Ces matériaux présentent une structure ouverte due à leur caractère bidimensionnel favorable à l'intercalation d'une large diversité de molécules organiques ou de macromolécules. Les molécules invitées sont alors préservées entre deux feuillets inorganiques présentant une expansion modulable en fonction de la taille de la molécule à intercaler. Leur charge positive permet l'immobilisation de molécules fonctionnelles dont les propriétés électriques sont compatibles avec les feuillets. De plus, les méthodes de préparation de ces matériaux, par nature en conditions de « Chimie Douce » sont extrêmement favorables au maintien de l'intégrité chimique et biologique de la biomolécule invitée.

### *III.3.1 Transferts de biomolécules*

La première application visée concerne le transport et le relargage contrôlé de biomolécules à visée thérapeutique (gènes ou médicaments) vers des cellules cibles. Le rôle de la structure hôte est en premier lieu de protéger les biomolécules au cours du transport contre les possibles agressions chimiques du milieu. L'HDL a ensuite un effet favorable de par ses propriétés de charges des feuillets pour le transfert transmembranaire par exemple. Enfin grâce à ses propriétés d'échange anionique ou sa solubilité en pH faiblement acide, la matrice permet le relargage de la molécule active dans le milieu. L'utilisation de ces matériaux bio-inorganiques devrait permettre une augmentation et une prolongation de l'efficacité du médicament, une diminution des effets secondaires, une réduction de la fréquence d'administration et une diminution des dosages.

Une étude <sup>47</sup> a été menée afin d'étudier l'effet clinique de l'injection intraveineuse d'une suspension de particules [Mg<sub>2</sub>-Al-Cl] d'environ 100 nm de dimension moyenne chez le rat. Les résultats ont montré que ces matériaux inorganiques avaient peu d'effets systémiques bien qu'au-delà d'un certain dosage, l'argile provoque des effets indésirables attendus. De plus, des irritations au niveau des sites d'injection ont été constatées mais peuvent être évitées en modifiant la technique d'injection; par exemple en utilisant un cathéter. Les doses injectées lors de cette étude sont supérieures à celles qui auraient pu être faites dans les conditions usuelles. Il est donc

---

<sup>47</sup> S.Y. Kwak, W. M. Kriven, M.A. Wallig, J.H. Choy, *Biomaterials*, 25, 2004, 5995-6001

nécessaire d'effectuer d'autres tests avec des concentrations plus faibles et par la même occasion d'examiner l'effet irritant.

Choy et coll<sup>48</sup> ont réussi l'immobilisation de fragments d'ADN dans les hydroxydes doubles lamellaires de type  $[Mg_2-Al-NO_3]$  dans l'idée de développer des matériaux vecteurs de gènes (Figure 24) pour des visées de thérapie génique par simple échange anionique. Ils montrent de plus que l'interaction des groupements phosphates avec le feuillet cationique influence l'orientation de la molécule invitée. La conformation hélicoïdale de l'ADN va avoir, alors, tendance à se positionner parallèlement aux feuillets conduisant à des distances interlamellaires modérées (2,39 nm). Les caractérisations physico-chimiques confirment que la molécule ne se détériore pas pendant la synthèse. Des tests préliminaires sur le relargage ont aussi été réalisés; la libération totale des brins d'ADN intervient pour des pH inférieurs à 3,0, pH pour lesquels la matrice HDL est détruite. Une étude *in vivo* plus approfondie<sup>49</sup> a montré que le matériau hybride HDL-ADN pénètre dans la cellule par voie endocytomique. Une fois dans la cellule, la dissolution progressive de la matrice hôte due au faible pH du lysosome et l'échange anionique possible avec les ions contenus dans l'électrolyte de la cellule libèrent les fragments d'ADN.

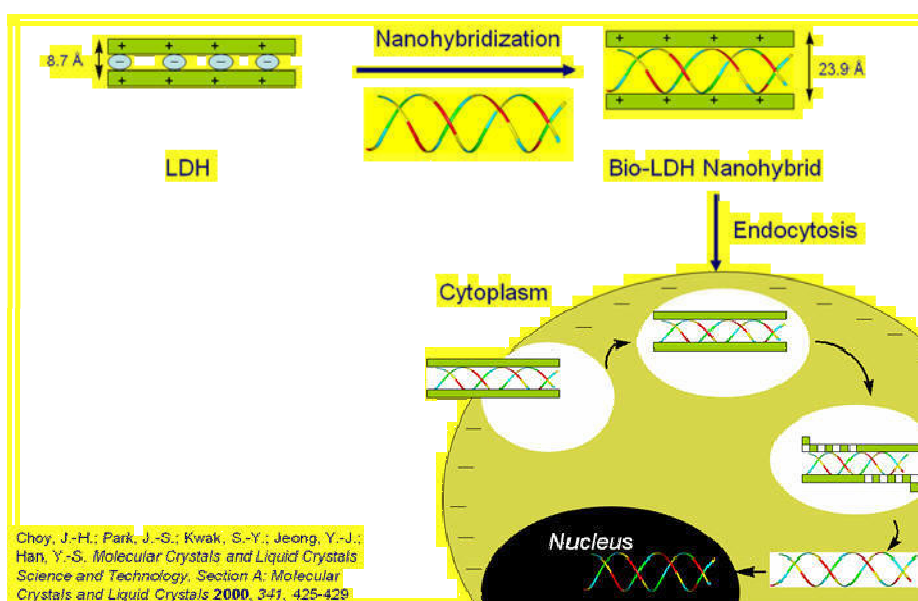


Figure 24 : Transfert de l'ADN jusqu'à la cellule <sup>48</sup>

<sup>48</sup> J.H. Choy, S.Y. Kwak, J.S. Park, Y. J. Jeong, J. Portier, *J American Chemical Society*, 121, 1999, 1399-1400

<sup>49</sup> J.H. Choy, S.Y. Kwak, Y.J. Jeong, J.S. Park, *Angew Chem Int ed, Communications*, 39, n° 22, 2000, 4041-4045

Une étude complémentaire<sup>50</sup> a confirmé la vectorisation et le relargage d'un oligonucléotide par une matrice  $[\text{Mg}_2\text{-Al-NO}_3]$  dans une cellule infectée. Les résultats ont montré une diminution de la croissance de la cellule cancéreuse lors de l'incubation en présence de matériau hybride. Il a aussi été montré que l'hydroxyde double lamellaire n'avait pas d'effet cytotoxique sur la cellule ce qui veut dire qu'il agit seulement comme porteur de gènes. D'autres molécules comme l'adénosine-5'-monophosphate (AMP), la guanosine-5'-monophosphate (GMP) et la cytidine -5'-monophosphate (CMP) ont pu aussi être intercalées<sup>51</sup> dans des matrices  $[\text{Mg}_2\text{-Al-NO}_3]$ . Ces deux exemples ont mis en évidence que les hydroxydes doubles lamellaires sont des candidats potentiels comme vecteurs de biomolécules.

### III.3.2 Transferts de médicaments

Divers médicaments ont pu être encapsulés dans des HDL. Ces molécules sont stabilisées dans le domaine interlamellaire sans perdre leurs propriétés chimiques ni leurs activités biologiques. Et elles peuvent par la suite être relarguées par dissolution de la matrice inorganique dans un milieu acide ou par échange anionique.

Les vitamines<sup>52,53</sup> telles que l'acide rétinolique (vitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C) et le tocophérol (vitamines E) sont très sensibles à la lumière, la température ou l'oxygène, ce qui limitent leur application comme ingrédients dans la cosmétique, l'agro-alimentaire, la médecine. L'acide  $\alpha$ -(+)-tocophérol succinate (ATS), médicament anti-cancéreux, possède des propriétés liposolubles empêchant son accès dans les cellules. Pour remédier à ces désavantages, il est nécessaire d'immobiliser ces molécules actives dans un vecteur de relargage. Elles sont facilement intercalées dans les hydroxydes doubles lamellaires de type  $[\text{Zn}_R\text{-Al-NO}_3]$  puis transférées dans le corps sans problème de solubilité, ou de contact avec le milieu extérieur. Ce confinement permet de les stabiliser, d'augmenter leur durée de vie, puis de les libérer de façon contrôlable ce qui allège les effets secondaires.

Des agents anti-inflammatoires comme l'ibuprofène<sup>54</sup>, ont été intercalés dans une phase  $[\text{Mg}_2\text{-Al-Cl}]$  pour éviter les effets secondaires provoqués par de trop forts dosages. Le relargage dépend de la structure moléculaire de la molécule active et de la force des interactions qu'elle génère avec la structure hôte. Par exemple, dans le cas de l'ibuprofène, le relargage est plus progressif que pour le

<sup>50</sup> S.Y Kwak, Y. J. Jeong, J.S. Park, J.H Choy, Solid State Ionics, 151, 2002, 229-234

<sup>51</sup> J.H. Choy, S.Y. Kwak, J.S. Park, Y. J. Jeong, J. Materials Chemistry, 11, 2001, 1671-1674

<sup>52</sup> S.H. Hwang, Y.S. Han, J.H. Choy, Bull, Korean Chemical Society, 22, n°9, 2001, 1019-1022

<sup>53</sup> Y.H. Son, S.Y. Kwak, J.H. Choy, 10th International Ceramics Congress- part b, 2003, 593-600

<sup>54</sup> V. Ambroggi, G. Fardella, G. Grandolini, L. Perioli, International Journal of Pharmaceutics, 220, 2001, 23-32



Neo-Mindol®. D'autres molécules<sup>55</sup> présentant les mêmes applications ont pu être intercalées dans une phase [Li<sub>2</sub>-Al-Cl] comme le diflonaque, le naproxen.

Des anti-cancéreux comme les dérivés des acides foliques<sup>56</sup> tels que l'acide folinique et le methotrexate ont été immobilisés dans des hydroxydes doubles lamellaires [Mg<sub>2</sub>-Al-NO<sub>3</sub>] afin de minimiser la quantité de médicaments administrés. En effet, à cause de leur temps de vie faible dans le plasma, il est nécessaire de prescrire une forte dose. Cet excès peut occasionner une résistance aux médicaments et une toxicité non spécifique dans la prolifération des cellules. Le matériau hybride formé peut se transporter vers la cellule grâce à une meilleure perméabilité sans altérer la molécule active, puis se décomposer en la libérant sans provoquer d'effets secondaires apparents. Des biotests ont été effectués in vitro dans une cellule cancéreuse. Le methotrexate immobilisé a été comparé à celui libre. Les résultats montrent que le matériau hybride est plus efficace dès le début du traitement en ce qui concerne la suppression de la cellule cancéreuse.

Des citrates<sup>57</sup> ont été immobilisés dans des hydroxydes doubles lamellaires de type [Mg<sub>2</sub>-Al-NO<sub>3</sub>] pour étudier leur effet anti-acide. Lors du relargage, le pH du milieu augmente progressivement jusqu'à pH = 4 ce qui accentue l'effet tampon des matériaux et confirme leur intérêt dans ce type d'application.

### III.3.3 Immobilisation d'enzymes

L'immobilisation d'enzymes dans les hydroxydes doubles lamellaires crée une nouvelle classe de matériaux hybrides catalytiquement actifs vis à vis d'une large palette de réactions chimiques (hydrolyse, polymérisation, isomérisation, réaction redox) et présente donc un intérêt fondamental. La problématique en terme d'immobilisation devient plus compliquée ici car elle doit tenir compte de la complexité structurale des enzymes, de leur taille élevée ( $\approx 10$  nm par monomère), de la préservation de leur intégrité structurale. Les interactions Enzymes-HDL se développant au niveau des briques moléculaires des enzymes, c'est à dire les résidus acides aminés, il nous a semblé incontournable de rapporter, dans un premier temps, l'intercalation d'acides aminés dans les matrices HDL.

<sup>55</sup> A.I. Khan, L. Lei, A.J. Norquist, D. O'Hare, Chemical Communications, 22, 2001, 2342-2343

<sup>56</sup> J.H. Choy, J.S. Juang, J.M. Oh, M. Park, J. Jeong, Y.K. Kang, O.J. Han, Biomaterials, 25, 2004, 3059-3064

<sup>57</sup> J. Tronto, M.J dos Reis, F. Silvério, V. R. Balbo, J.M. Marchetti, J.B. Valim, J. of Physics and Chemistry of Solids, 65, 2004, 475-480

La première étude sur l'intercalation des acides aminés tels que l'acide aspartique, l'acide glutamique dans des phases  $[\text{Mg}_2\text{-Al-NO}_3]$ , a été réalisée par Stephen Mann et coll<sup>46</sup>. Les matériaux hybrides ont été préparés par coprécipitation à pH élevé, pH auxquels les acides aminés présentent une charge globalement négative. La molécule invitée, préalablement dissoute dans une solution de soude, se trouve alors sous sa forme anionique. L'intercalation provoque de manière générale un désordre structural puisque le matériau ne montre pas une bonne cristallinité. De plus, les techniques de caractérisation ont souvent confirmé un taux d'intercalation incomplet avec la présence de deux phases d'HDL, une comportant l'acide aminé et une comportant l'anion issu des sels métalliques utilisés lors de la synthèse. Dans le cas de l'intercalation de l'acide aspartique, les auteurs ont montré la possibilité de polymériser in-situ les monomères en un poly  $\alpha, \epsilon$  aspartate et donc de former un nouveau matériau hybride.

D'autres acides aminés ont été intercalés<sup>58, 59</sup> comme la phénylalanine et la tyrosine. La méthode utilisée est la réaction d'échange anionique à pH=8 et à 65°C. Malheureusement cette méthode n'a pas empêché d'obtenir encore deux phases HDL. L'analyse thermique des matériaux hybrides ainsi préparés a toutefois montré une meilleure stabilité thermique de l'acide aminé intercalé par rapport à l'acide aminé pur, mettant en évidence le rôle stabilisateur de la matrice hôte.

Aisawa et coll se sont intéressés à l'intercalation de différents acides aminés dans plusieurs types de matrice HDL. Ils se sont penchés plus particulièrement sur l'intercalation de la phénylalanine par coprécipitation<sup>60</sup> ou par calcination - reconstruction<sup>61</sup>. La composition chimique et le pH influencent le taux d'intercalation. Pour la méthode de synthèse par coprécipitation, la quantité d'acides aminés intercalés est supérieure à des pH de synthèse compris entre 8 et 9, au-delà elle diminue. De même, lors de la reconstruction du matériau calciné, un pH = 7 montre une intercalation plus favorable qu'à pH = 10,5. Aux pH proches de la neutralité, la molécule organique est zwitterionique ce qui implique une co-intercalation avec d'autres anions pour compenser la charge des feuillettes. Par contre à des pH nettement supérieurs, l'acide aminé est basique. Cependant, la compétition avec des anions tels que  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{OH}^-$  de densité de charge plus élevée montre une intercalation plus favorable pour ces molécules parasites. La nature de la chaîne latérale de l'acide aminé joue un rôle important sur l'intercalation. Il est préférable d'insérer

<sup>58</sup> A. Fudala, I. Palinko, I. Kiricsi, J. Molecular structure, 482-483, 1999, 33-37

<sup>59</sup> A. Fudala, I. Palinko, I. Kiricsi, Inorganic chemistry, 38, 1999, 4653-4658

<sup>60</sup> S. Aisawa, S. Takahashi, W. Ogasawara, Y. Umetsu, E. Narita, J of Solid State Chemistry, 162, 2001, 52-62

<sup>61</sup> S. Aisawa, H. Kudo, T. Hoshi, S. Takahashi, H. Hirahara, Y. Umetsu, E. Narita, J. of Solid State Chemistry, 177, 2004, 3987-3994

des molécules hydrophobes, des molécules ayant une charge négative à l'extrémité de la chaîne ou des molécules neutres.

L'orientation de l'acide aminé dans l'espace interlamellaire est différent : soit l'acide aminé est intercalé horizontalement (pas de modification de la distance interlamellaire), soit verticalement (modification de la distance interlamellaire). Dans le cas de la phénylalanine, ces deux représentations existent mais dépendent du pH. L'orientation verticale est préférée lors de l'intercalation de la molécule amphotère alors que l'orientation horizontale est suggérée lors de l'intercalation de la molécule anionique.

Tous les acides aminés à l'exception de la lysine et l'arginine, ainsi que des peptides<sup>62</sup>, ont été intercalés dans une matrice HDL. La stabilisation de l'espèce invitée est provoquée par liaisons hydrogène. La désintercalation de l'acide aminé a lieu par échange anionique dans une solution de  $K_2CO_3$ .

En conclusion, il est difficile d'obtenir un matériau hybride acide aminé - hydroxyde double lamellaire pur. La forme amphotère de la biomolécule montre une accessibilité plus importante avec l'espace interlamellaire mais ne suffit pas à neutraliser le matériau. Pour compenser ce déficit de charge, d'autres anions sont co-intercalés. De plus, des anions possédant une densité de charge plus élevée tel que  $CO_3^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $OH^-$  sont plus favorables à l'intercalation que les acides aminés anioniques.

L'enzyme, pénicilline G acylase a été immobilisée dans des hydroxydes doubles lamellaires de type  $[Mg_R-Al-NO_3]$ . Deux méthodes de confinement ont été étudiées.

La première méthode consiste à encapsuler l'enzyme dans la matrice inorganique lors de sa reconstruction après calcination. Toutefois, l'enzyme est adsorbée à la surface du matériau inorganique calciné et empêche la régénération de la matrice HDL. L'activité enzymatique de l'enzyme est influencée par la composition de la matrice inorganique et par la température de calcination. Cet article sera détaillé dans le chapitre 3.

La deuxième méthode consiste à greffer l'enzyme avec le glutaraldéhyde préalablement intercalé dans la matrice hôte. Dans un premier temps, l'acide glutamique est intercalé entre les feuillets HDL pour augmenter la distance interlamellaire et pour faciliter l'intercalation du glutaraldéhyde. Enfin, l'enzyme va venir se greffer au niveau des groupements aldéhydes libres. Les tests

---

<sup>62</sup> H. Nakayama, N. Wada, M. Tsuchioka, International Journal of Pharmaceutics, 269, 2004, 469-478

enzymatiques ont montré que l'enzyme immobilisée était plus stable vis-à-vis de la température et du stockage et de l'acidité.

### III.3.4 Immobilisation de polluants

Les hydroxydes doubles lamellaires ont montré une aptitude à stabiliser des molécules pour des actions liées à la médecine. Mais, grâce à leur capacité anionique élevée, ils montrent aussi un intérêt pour l'adsorption de molécules polluantes pour l'environnement. Ces propriétés d'adsorption peuvent être valorisées dans des applications où le matériau HDL joue le rôle de matrice hôte pour l'immobilisation d'enzymes biactives pour la détection ou la dégradation de polluants organiques ou inorganiques. Dans ce cas la matrice HDL pourra aussi avoir un rôle d'accumulateur du substrat autour des biomolécules.

Le piégeage de divers polluants aqueux<sup>63</sup> tels que le 2,4,6-trinitrophénol (TNT) et le dodécylbenzylsulfonate (DBS) par des composés hydroxydes doubles lamellaires [Mg<sub>3</sub>-Al-Cl] et [Mg<sub>3</sub>-Al-CO<sub>3</sub>] et leurs produits calcinés a pu être mis en œuvre par échange anionique ou procédé de calcination/reconstruction. Lors de l'échange, il est préférable d'utiliser un précurseur chloré que carbonaté. L'affinité des carbonates pour les hydroxydes doubles lamellaires favorise la stabilité de l'anion entre les feuillets et empêche la substitution avec d'autres composés anioniques. Inversement, l'adsorption des polluants avec la matrice calcinée est influencée par la cristallinité du précurseur. L'augmentation de la cristallinité améliore la régénération de l'HDL lors de sa reconstruction et agrandit la capacité d'adsorption.

D'autres études ont montré les capacités des hydroxydes doubles lamellaires [Mg<sub>R</sub>-Al-X] avec X = CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>3-</sup> à adsorber des herbicides<sup>64</sup> (acide 4-chloro-2-méthylphénoxyacétique), le glyphosate<sup>65</sup>. L'adsorption est influencée par le pH, la capacité d'échange anionique de la matrice, et la nature de l'anion intercalé. L'adsorption de cette molécule a lieu par échange anionique. Les molécules sont alors stabilisées par intercalation dans le matériau.

Ces résultats confirment l'intérêt porté sur les hydroxydes doubles lamellaires comme adsorbants de polluants. De plus, en fonction de la nature du composé nocif, il est possible d'adapter les conditions de piégeage (pH, température, nature de la matrice, technique d'adsorption, durée) pour une meilleure efficacité.

<sup>63</sup> M.A. Ulibarri, I. Pavlovic, C. Barriga, M.C. Hermosin, J. Cornejo, *Applied Clay Science*, 18, 2001, 17-27

<sup>64</sup> J. Inacio, C. Taviot-Guého, C. Forano, J.P. Besse, *Applied Clay Science*, 18, 2001, 255-264

<sup>65</sup> F. Li, Y. Wang, Q. Yang, D. G. Evans, C. Forano, X. Duan, *Journal of Hazardous Materials*, in press



## **Chapitre 2**

# **Préparation de phases [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl] par décomposition thermique ou enzymatique de l'urée.**



## Sommaire

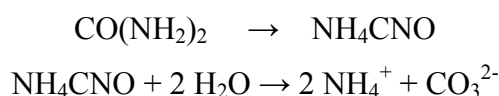
<b><i>I</i></b>	<b><i>Introduction</i></b>	<b>65</b>
<b><i>II</i></b>	<b><i>Etude Bibliographique</i></b>	<b>66</b>
<b><i>II.1</i></b>	<b><i>Synthèse d'HDL par décomposition thermique de l'urée</i></b>	<b>66</b>
<b><i>II.2</i></b>	<b><i>Synthèse d'oxydes par décomposition enzymatique de l'urée</i></b>	<b>67</b>
<b><i>III</i></b>	<b><i>Synthèse de <math>[Zn_2-Al-Cl]</math> par décomposition thermique</i></b>	<b>69</b>
<b><i>III.1</i></b>	<b><i>Synthèse</i></b>	<b>69</b>
<b><i>III.2</i></b>	<b><i>Etude des paramètres influençant la synthèse</i></b>	<b>70</b>
<b><i>III.2.1</i></b>	<b><i>Effet du temps de réaction</i></b>	<b>70</b>
<b><i>III.2.2</i></b>	<b><i>Effet de la température d'hydrolyse de l'urée et du rapport <math>[urée]/[sels]</math></i></b>	<b>83</b>
<b><i>III.3</i></b>	<b><i>Etude des propriétés morphologiques</i></b>	<b>87</b>
<b><i>III.4</i></b>	<b><i>Discussion sur la formation de la phase HDL <math>[Zn-Al]</math></i></b>	<b>89</b>
<b><i>IV</i></b>	<b><i>Synthèse de <math>[Zn_2-Al-Cl]</math> par décomposition enzymatique de l'urée</i></b>	<b>92</b>
<b><i>IV.1</i></b>	<b><i>Synthèse</i></b>	<b>93</b>
<b><i>IV.2</i></b>	<b><i>Etude des paramètres influençant la synthèse</i></b>	<b>93</b>
<b><i>IV.2.1</i></b>	<b><i>Effet de la concentration d'uréase</i></b>	<b>93</b>
<b><i>IV.2.2</i></b>	<b><i>Effet du temps</i></b>	<b>95</b>
<b><i>IV.2.3</i></b>	<b><i>Effet de la concentration d'urée</i></b>	<b>96</b>
<b><i>IV.2.4</i></b>	<b><i>Effet de l'activité enzymatique</i></b>	<b>98</b>
<b><i>IV.3</i></b>	<b><i>Etude morphologique</i></b>	<b>101</b>
<b><i>IV.4</i></b>	<b><i>Discussion</i></b>	<b>103</b>
<b><i>V</i></b>	<b><i>Extension des synthèses à d'autres systèmes HDL <math>[M^{II}-M^{III}]</math></i></b>	<b>103</b>
<b><i>V.1</i></b>	<b><i>Hydrolyse thermique</i></b>	<b>104</b>
<b><i>V.1.1</i></b>	<b><i>Effet des ions métalliques en solution</i></b>	<b>104</b>



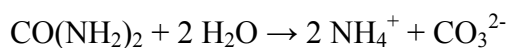
V.1.2	<i>Etude structurale</i> .....	106
V.1.3	<i>Etude morphologique</i> .....	107
V.2	<b><i>Hydrolyse enzymatique</i></b> .....	108
V.2.1	<i>Effet des cations</i> .....	109
V.2.2	<i>Etude structurale</i> .....	111
V.2.3	<i>Comportement de l'enzyme</i> .....	113
V.2.4	<i>Etude morphologique</i> .....	113
VI	<b><i>Comportement thermique des phases HDL <math>[\text{M}^{\text{II}}\text{-M}^{\text{III}}]</math> préparées par hydrolyse de l'urée</i></b> .....	115
VII	<b><i>Conclusion</i></b> .....	120

## I Introduction

Dans la quête de nouveaux matériaux à propriétés fonctionnelles spécifiques, le contrôle des propriétés morphologiques (surface spécifique, porosité, taille et forme des particules) apparaît comme une étape obligée de la stratégie d'élaboration. Dans le cas des matériaux HDL, les applications potentielles peuvent viser soit des propriétés de « bulk » (catalyse supportée stéréosélective) soit des propriétés de surface ou d'interface (procédés d'adsorption). C'est pourquoi depuis quelques années, un nombre important de travaux dans ce domaine concerne le développement de procédés de synthèse à propriétés morphologiques contrôlées. La méthode de préparation des composés HDL par coprécipitation a été largement développée dans notre laboratoire<sup>1,2</sup> et a fait l'objet d'une investigation particulière en terme de propriétés texturales générées. La caractéristique principale de ce procédé montre que les étapes de nucléation et de croissance sont généralement confondues suite à une sursaturation de l'agent de précipitation (OH<sup>-</sup>). Ce phénomène entraîne alors une polydispersité de la taille des particules qui est favorisée par un vieillissement de type Oswald. Pour favoriser la monodispersité des particules d'argile, il est nécessaire de séparer ces deux étapes de précipitation en utilisant une base retard. L'agent de précipitation utilisé peut être alors l'urée. Cette molécule est une base de Brønsted très faible (pK<sub>b</sub> = 13,8), fortement soluble dans l'eau. Selon Shaw et Bordeaux<sup>3</sup>, l'hydrolyse de l'urée s'effectue en deux étapes : i) formation de cyanate d'ammonium (NH<sub>4</sub>CNO) (étape déterminante), et ii) hydrolyse rapide en carbonate d'ammonium.



La réaction globale qui se produit est la suivante :



La réaction est initiée à des températures supérieures à 70°C. La précipitation par l'urée est dite « homogène », c'est-à-dire contrôlée par la vitesse de décomposition de l'urée.

<sup>1</sup> De Roy A., Forano C., El Malki M., Besse J-P., Anionic clays: trends in pillaring chemistry. In: M.L. Occelli and H.E. Robson (Editors), Synthesis of microporous materials, Expanded Clays and Other Microporous Solids. Van Nostrand Reinhold, New York, 1992, pp108-170

<sup>2</sup> Z. Chang, D. G. Evans, X. Duan, C. Vial, J. Ghanbaja, V. Prevot, M. De Roy, C. Forano, Journal of Solid State Chemistry, 178 (9), 2005, 2766-2777

<sup>3</sup> W. H. R. Shaw, J. Bordeaux, J. American Chemical Society, 1955, 4729-4733

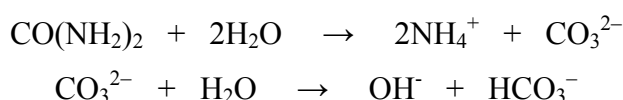
Basé sur ce principe, nous avons mis au point une nouvelle méthode de précipitation des HDL qui consiste à hydrolyser l'urée à température ambiante par un catalyseur enzymatique : l'uréase.

## II Etude Bibliographique

### II.1 Synthèse d'HDL par décomposition thermique de l'urée

Constantino et coll<sup>4</sup> ont été les premiers à mettre au point une nouvelle méthode de préparation d'Hydroxydes Doubles Lamellaires par décomposition thermique de l'urée. Depuis, plusieurs études<sup>5,6,7,8</sup> ont été réalisées essentiellement sur les phases [Mg-Al], [Zn-Al], [Ni-Al], [Li-Al]. La formation de la phase [Mg-Fe] et la difficulté d'élaborer des phases avec des cations tels que Cr<sup>3+</sup> et Cu<sup>2+</sup> ont été citées.

Le protocole consiste à hydrolyser de l'urée à des températures voisinant 90°C pour libérer des ions OH<sup>-</sup> qui vont former dans une solution contenant des sels de métaux divalents et trivalents l'hydroxyde double lamellaire.



La formation des Hydroxydes Doubles Lamellaires est gouvernée par les conditions expérimentales. L'obtention d'une phase HDL carbonatée de cristallinité élevée a été réalisée pour des températures supérieures à 90°C et un temps de précipitation de 24 heures. En dessous de cette température, le degré de cristallinité s'affaiblit. En outre, la même phase a pu être préparée en un temps plus court dans un autoclave<sup>6</sup> sous pression autogène pour des températures supérieures à 100 °C.

L'obtention de la phase HDL passe par la formation d'un gel d'hydroxyde d'aluminium qui a été mis en évidence au début de la précipitation de [Mg<sub>3</sub>-Al-CO<sub>3</sub>] ou dans le cas d'un rapport initial (R) Mg<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> = 1<sup>5</sup>. Au delà de R = 4, il se forme du MgCO<sub>3</sub>.

<sup>4</sup> U. Costantino, F. Marmottini, M. Nocchetti, R. Vivani, Eur. J. Inorganic Chemistry, 1998, 1439-1446

<sup>5</sup> M. M. Rao, B. R. Reddy, M. Jayalakshmi, V. S. Jaya, B. Sridhar, Materials Research Bulletin, 40, 2005, 347-359

Les analyses morphologiques montrent des particules individuelles, bien définies, de forme hexagonale et monodisperse dont la taille varie entre 1 et 5 µm. Ogawa et coll<sup>6</sup> ont montré la possibilité de précipiter des particules de 20 µm en diminuant la concentration des sels. Par ailleurs, la comparaison<sup>7</sup> avec des particules préparées par coprécipitation puis traitées par voie hydrothermale pour améliorer la cristallinité, montre la formation de particules dix fois plus grosses dans ce type de procédé. La dimension des particules peut être contrôlée en contrôlant la température, la concentration des sels et le temps de précipitation. L'accroissement des deux premiers facteurs entraîne une diminution de la taille des particules. Inversement, la prolongation de la synthèse favorise la croissance cristalline. La diminution de la vitesse d'hydrolyse de l'urée conduit à la formation de particules plus larges.

Pour diminuer la dimension des particules<sup>8</sup>, une étude a été réalisée sur l'effet de solvants organiques polaires au niveau de la formation des HDL. Ces molécules vont venir empêcher l'accès de la surface du matériau et atténuer l'adsorption et la nucléation des cations sur les groupements hydroxyles. La vitesse de croissance sera ralentie. L'utilisation d'éthanol pur empêche la formation d'HDL; seul l'hydroxyde d'aluminium est formé dans ces conditions. Par contre, l'emploi d'éthylène glycol permet la précipitation de petites particules d'HDL.

La formation d'Hydroxyde Double Lamellaire cristallisé nécessite donc les conditions suivantes:

- Température > 90 °C
- Durée > 24 h (90 °C)
- Rapport  $M^{II}/M^{III} = 2, 3$

L'influence des paramètres (temps, température, concentration) de synthèse sur le mécanisme de formation des hydroxydes doubles lamellaires reste assez peu explorée. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux différentes étapes de précipitation de la phase [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl], précurseurs d'immobilisation pour enzymes.

## ***II.2 Synthèse d'oxydes par décomposition enzymatique de l'urée***

Par voie enzymatique, en utilisant l'uréase, la décomposition de l'urée s'opère sous des conditions douces (température ambiante, pression atmosphérique). Les enzymes sont des catalyseurs biologiques et comme tels, ils augmentent la vitesse de réaction mais ne sont pas

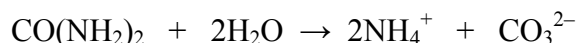
---

<sup>6</sup> M. Ogawa, H. Kaiho, Langmuir, 18, 4240-4242, 2002

<sup>7</sup> J. M. Oh, S. H. Hwang, J. H. Choy, Solid State Ionics, 2002, 285-291

<sup>8</sup> M. Adachi-Pagano, C. Forano, J.P. Besse, J. Material Chemistry, 13 (8), 2003, 1988-1993

consommés pendant la réaction. L'uréase dont le site actif est constitué d'un complexe binucléaire de Ni<sup>2+</sup>, catalyse l'hydrolyse de l'urée dans un domaine de pH allant de 4 à 10 suivant la réaction finale :



L'uréase est produite par plusieurs bactéries, différentes espèces de levures, de plantes et décompose l'urée, molécule de biodégradation de substances organiques.

Cet enzyme joue un rôle dans la formation de cristaux intracellulaires, dans la précipitation par des bactéries<sup>9</sup> de calcite, en réparation de surface de réseaux poreux, et dans les fissures de granites et bétons. La formation de carbonates naturels peut donc être obtenue par décomposition enzymatique de l'urée. En effet, les formations de sulfate d'aluminium<sup>10,11</sup>, de carbonate<sup>12,13,14</sup> métallique, d'hydroxyapatite<sup>15</sup> ont été rapportées dans la littérature selon ce type de procédé.

La vitesse de formation des composés est gérée par l'activité de l'enzyme et la quantité d'enzyme utilisée, toutefois ce paramètre ne semble pas influencer sur la cristallinité et la morphologie du solide préparé<sup>13</sup>. Dans le cas de la formation de carbonates de calcium, quelques minutes<sup>13,14</sup> suffisent pour précipiter cette phase, alors que plusieurs heures sont nécessaires pour précipiter du sulfate d'aluminium dans des conditions équivalentes. Contrairement aux résultats de l'hydrolyse thermique, les composés montrent une faible cristallinité avec des particules beaucoup plus petites. La précipitation de carbonates métalliques passe par l'intermédiaire d'une phase amorphe qui cristallise en fonction de l'évolution du pH. La précipitation de sulfate d'aluminium montre uniquement la présence d'une phase amorphe.

L'activité enzymatique<sup>10</sup> est un facteur prédominant pour la synthèse de matériau puisqu'elle contrôle la décomposition de l'urée. L'augmentation de l'activité enzymatique entraîne l'augmentation du pH liée à la libération de OH<sup>-</sup> issus de la décomposition de l'urée. Cette augmentation favorise la précipitation. Cependant, l'activité de l'enzyme peut être affectée par quelques facteurs tels que la présence de cations, le pH et la concentration du substrat.

<sup>9</sup> S. Stocks-Fischer, J. K. Galinat, S. Bang, Soil Biology Biochemistry, 31, 1999, 1563-1571

<sup>10</sup> R.E. Simpson II, C. Habeger, A. Rabinovich, J.H. Adair, J. American Ceramic Society, 81, 1998, 1377-1379

<sup>11</sup> F. Kara, G. Sahin, J. European Ceramic Society, 20, 2000, 689-694

<sup>12</sup> K.L. Bachmeier, A.E. Williams, J.R. Warmington, S.S. Bang, J. Biotechnology, 93, 2002, 171-181

<sup>13</sup> I. Sondi, E. Matijevic, Chemistry of Materials, 15, 2003, 1322-1326

<sup>14</sup> I. Sondi, E. Matijevic, J. Colloid and Interface. Science, 238, 2001, 208-214

<sup>15</sup> D. Bayraktar, A.C. Tas, J. Materials Science Letters, 20, 2001, 401-403

Pour des rapports urée/uréase trop faibles, la précipitation n'a pas lieu. L'inhibition peut être due aux cations en solution. Certains cations métalliques se lient au site actif de l'enzyme et empêche la liaison avec le substrat. Une étude<sup>16</sup> a été entreprise sur l'inhibition d'enzymes par des métaux lourds. Il a été trouvé qu'ils avaient un effet inhibiteur dans l'ordre décroissant suivant : Hg<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > Cd<sup>2+</sup> > Ni<sup>2+</sup> > Pb<sup>2+</sup> > Co<sup>2+</sup> > Fe<sup>3+</sup> > As<sup>3+</sup>. La sensibilité de l'uréase pour les ions de métaux lourds est due à la présence de multiples résidus de cystéines, dont un est localisé près du site actif de l'enzyme. La décomposition de l'urée est alors affectée, un ralentissement de la précipitation est alors observé<sup>12</sup>.

Nous avons étendu cette méthode à la précipitation des Hydroxydes Doubles Lamellaires.

### *III Synthèse de [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl] par décomposition thermique*

#### *III.1 Synthèse*

La décomposition thermique de l'urée a été utilisée pour préparer la phase HDL [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl]. Lors de la préparation de ce matériau, trois paramètres ont été étudiés : le temps de réaction, la température et la concentration d'urée, paramètres pouvant influencer fortement soit la composition chimique soit les propriétés structurales et texturales des phases HDL.

Le protocole utilisé est le suivant : 20 ml d'une solution de chlorures de zinc et d'aluminium dans un rapport Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> = 2 et de concentration 1M est ajoutée dans 100 ml d'eau décarbonatée contenant de l'urée dissoute dans un rapport [urée]/[sels] = 3,3 ou 10,0. Le mélange réactionnel est alors placé à reflux à 90 ou 100°C sous atmosphère d'azote. La réaction est agitée en continu et stoppée à différents temps, puis refroidie sous courant d'eau froide. Le produit obtenu est alors centrifugé et lavé 3 fois (V<sub>lavage</sub> = 40 mL) avec de l'eau décarbonatée, puis séché à température ambiante.

Afin d'identifier les différentes phases solides présentes au cours de la réaction, nous avons aussi réalisé ces synthèses pour des solutions initiales contenant uniquement le sel d'Al<sup>3+</sup> ou de Zn<sup>2+</sup>.

Les produits obtenus lors de ces différentes synthèses ont été caractérisés d'un point de vue structural par diffraction des rayons X, spectroscopie infrarouge, spectroscopie RMN et d'un

---

<sup>16</sup> W. Zaborska, B. Krajewska, Z. Olech, J. of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 19 (1), 2004, 65-69

point de vue morphologique par microscopie électronique à balayage, microscopie électronique à transmission couplé à la technique EDX. Des analyses chimiques permettant de définir leurs compositions ont été effectuées. Les suspensions prélevées à différents temps de réaction ont été caractérisées par diffusion de la lumière, les tailles de particules ont été mesurées.

### III.2 Etude des paramètres influençant la synthèse

#### III.2.1 Effet du temps de réaction

Pour identifier les différentes étapes de la formation de la phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]$ , le pH a été enregistré en continu (Figure 1). La cinétique de décomposition de l'urée pure et acidifiée à un pH de 2,2, équivalent aux conditions initiales de précipitation des hydroxydes métalliques, a été étudiée dans un premier temps. Dans des conditions identiques à la synthèse de l'HDL, l'urée est totalement décomposée en 40h. Pendant environ une heure, le pH augmente faiblement passant environ de 2,24 à 3,6. Puis, le pH s'élève rapidement (45 minutes) jusqu'à une valeur proche de 6,9 indiquant une production importante de  $\text{OH}^-$ . Cependant, dès que le pH de neutralisation est atteint, la solution est tamponnée, le pH augmente alors très légèrement (jusqu'à pH=7,9).

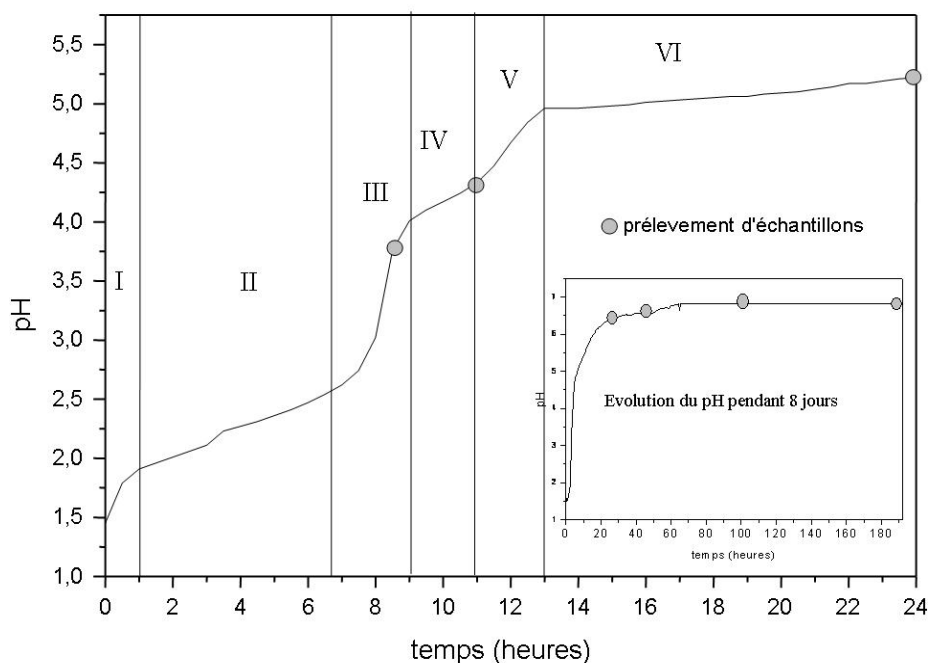


Figure 1 : Evolution du pH au cours de la synthèse de  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  par la méthode urée

Pour la synthèse de la phase HDL [Zn<sub>2</sub>-Al], différentes régions notées de I à VI ont été délimitées<sup>17</sup> et classées selon deux types de comportements. Les régions I, III et V montrent une évolution rapide du pH liée à la consommation de H<sup>+</sup> dans le milieu. Les régions II, IV et VI révèlent une réduction de l'évolution du pH relative à la consommation des ions OH<sup>-</sup> libérés par l'hydrolyse de l'urée ou bien à un effet tampon des espèces en solution.

Région I : l'augmentation du pH initial est provoquée par la seule réaction d'hydrolyse de l'urée.

Région II : Aucun échantillon solide n'a pu être isolé pour cette région de pH. La solution réactionnelle correspond à une suspension colloïdale difficile à centrifuger. A la fin de la région II, la solution commence à se troubler. Dans ce domaine de pH acide, seuls les ions Al<sup>3+</sup> sont susceptibles de réagir avec les ions OH<sup>-</sup> pour précipiter sous forme d'hydroxydes d'aluminium. La réaction de précipitation passe par la formation de précurseurs moléculaires solubles qui subissent des réactions de condensation de type olation et/ou oxolation. La consommation d'OH<sup>-</sup>, conduit évidemment à une réduction de la concentration de ces ions en solutions et limite toute précipitation supplémentaire de phases.

Région III : La remontée du pH indique un brusque arrêt de la réaction de formation des précurseurs moléculaires, les ions Al(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> ont totalement réagi dans l'étape II. Parallèlement, on note au cours de l'avancement de la réaction, un précipité de plus en plus perceptible à l'œil. Une analyse granulométrique révèle la présence de deux populations identifiées vers 330 nm (environ 80% de la population) et à 65 nm (environ 20 %). Les précurseurs moléculaires formés dans l'étape précédente se condensent pour former un solide. Les réactions de condensation ne sont pas consommatrices d'ions OH<sup>-</sup>.

Région IV : La consommation des ions OH<sup>-</sup> et/ou des HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, agents basiques, met en évidence la 2<sup>ème</sup> étape de précipitation. La suspension est alors beaucoup plus concentrée, les cations métalliques (Al<sup>3+</sup> et Zn<sup>2+</sup>) participent à la précipitation. A ce stade, la taille des particules atteint 800 nm. Au-delà, il est impossible de détecter des valeurs granulométriques à cause de l'état d'aggrégation.

Région V : Malgré un début de formation de la phase HDL, la quantité d'ions OH<sup>-</sup> libérée est supérieure à celle consommée par Zn<sup>2+</sup>.

---

<sup>17</sup> R.J.M.J, Vogels, J.T. Klopogge, J. W. Geus, J. Colloid and Interface Science, 285, 2005, 86-93



**Région VI:** La région VI correspond à la dernière étape de formation du matériau, la totalité des ions  $\text{Zn}^{2+}$  réagissent. L'hydrolyse de l'urée n'est pas terminée. La croissance lente du pH est associée à l'effet tampon engendré par la formation d'HDL. Les réactions de condensation entre particules conduisent à un relargage d'ions  $\text{OH}^-$  en solution.

Pour étudier la formation de la phase HDL  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]$ , des prélèvements de solides en suspension ont été effectués à différents degrés d'avancement de la réaction pour des régions d'évolution de pH bien distinctes (Tableau 1). Les analyses chimiques des différents échantillons sont données dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Résultats des analyses chimiques (fraction molaire)**

Echantillons	1	2	3	4	5	6
Temps de réaction	8h30	11h	24h	48h	96h	192h
Régions	III	IV	VI	VI	VI	VI
pH	3,80	4,20	5,25	6,55	6,80	6,80
$\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ théor.	2	2	2	2	2	2
$\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ Exp.	-	-	1,60	1,80	1,89	2,17
$\text{Cl}^-/\text{Al}^{3+}$	-	-	0,64	0,43	0,13	0,09
$\text{CO}_3^{2-}/\text{Al}^{3+}$	-	-	0,05	0,17	0,34	0,39
$(\text{Cl}^- + 2\text{CO}_3^{2-})/\text{Al}^{3+}$	-	-	0,74	0,77	0,81	0,87
% N			0,28	0,23	< 0,1	< 0,1

D'après le tableau 1, on voit que le rapport molaire  $\text{M}^{\text{II}}/\text{M}^{\text{III}}$  augmente en fonction du temps. Les rapports  $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  inférieurs au rapport théorique ( $R=2$ ) révèlent un excès d' $\text{Al}^{3+}$  par rapport à la composition attendue. Le déficit des charges  $\Sigma\text{Anions}/\text{Al}^{3+}$  infirme la possibilité d'une phase pure HDL présentant une composition plus riche en  $\text{Al}^{3+}$  que celle prévue. Il s'agit donc, pour cette série d'échantillons, de la présence d'une phase d'hydroxyde ou d'oxyhydroxyde d'Aluminium. Pour l'échantillon 3, 26% d' $\text{Al}^{3+}$  serait sous la forme d'hydroxyde pur si on suppose un rapport expérimental  $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+} = 2,0$ . Ce pourcentage diminue progressivement pour atteindre la stoechiométrie HDL attendue, dans la marge des erreurs analytiques. Les analyses montrent, aussi, une diminution de l'anion  $\text{Cl}^-$  au profit d'une augmentation des carbonates à partir de 24h de synthèse. Cette adsorption de carbonates explique aussi la stabilisation du pH dans ces régions. On observe donc un échange progressif des ions  $\text{Cl}^-$  par les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  dans la phase HDL. Par ailleurs, la présence d'azote de l'urée a

été détectée sur les phases 3 et 4. La quantité diminue parallèlement à l'échange des ions  $\text{Cl}^-$ , l'adsorption d'urée par la phase  $[\text{Zn-Al-CO}_3]$  semble donc impossible.

L'analyse des diffractogrammes des rayons X indique la formation d'hydroxydes doubles lamellaires dès le début de la précipitation (8h30) à côté d'une phase amorphe (Figure 2). La cristallinité et la pureté de la phase HDL s'améliorent au cours du temps (Figure 4) alors que le fond continu correspondant à la phase amorphe disparaît pratiquement au delà de 24h de réaction. Les échantillons prélevés entre 8h30 et 11 heures de synthèse montrent la présence d'une phase HDL moins bien cristallisée, toutefois les largeurs de raies de diffraction restent relativement faibles. Les distances interlamellaires mesurées sont relatives à la présence de petits anions dans les domaines interfoliaires, tels que  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  ou  $\text{OH}^-$ . La réflexion (110), caractéristique de la distance Métal-Métal dans les feuillets reste inchangée indiquant que le rapport Zn/Al entre 8h30 et 24h semble être identique.

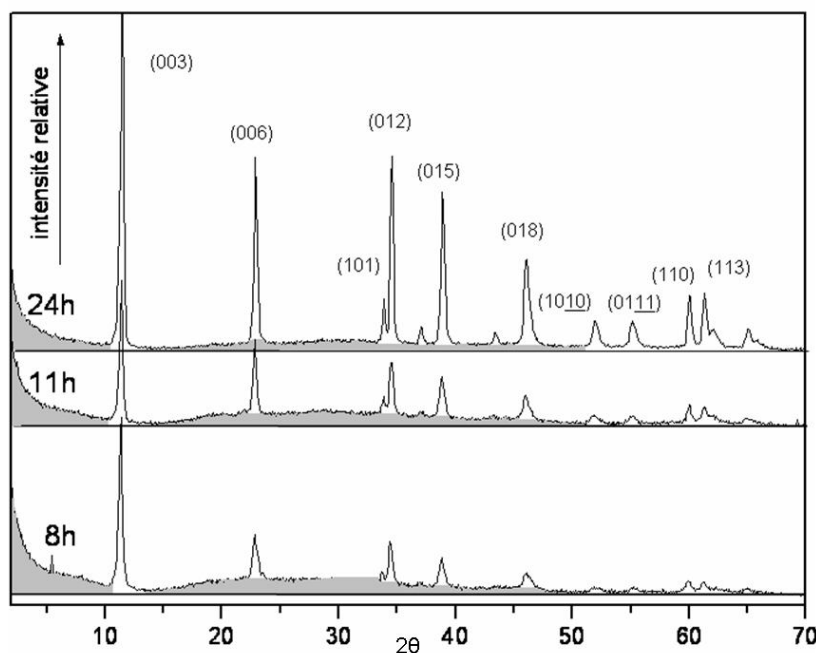


Figure 2 : Diffractogrammes des rayons X des échantillons 1, 2 et 3

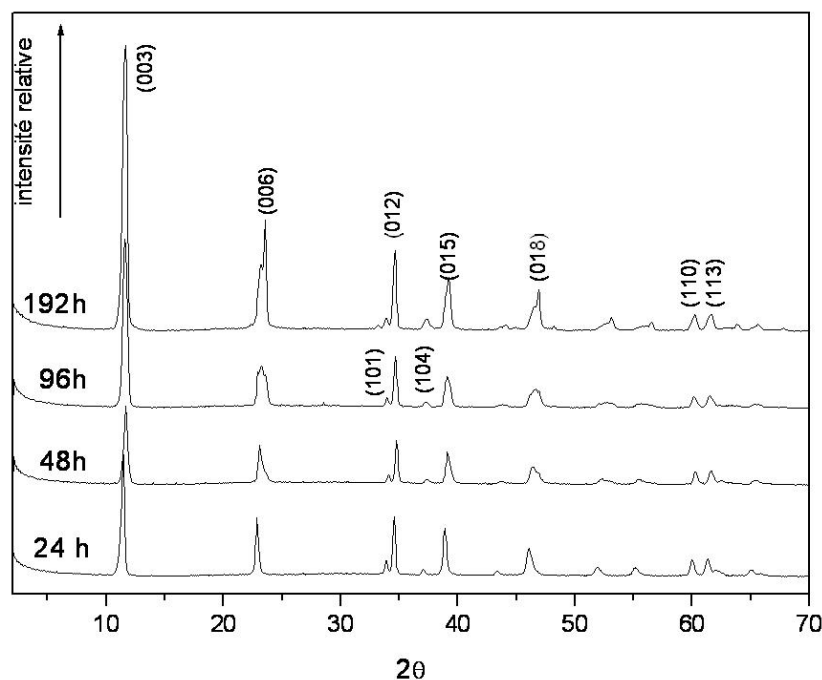


Figure 3 : Diffractogrammes des rayons X des échantillons 3, 4, 5 et 6

Afin d'améliorer la résolution des diffractogrammes réalisés sur les échantillons 3 à 6, des enregistrements ont été effectués dans de nouvelles conditions (voir Annexe 1. 7). La Figure 4 montre que la raie (110) passe de  $59,8$  à  $60,23^\circ$  en  $2\theta$  entre les échantillons 3 et 6. Ce décalage suggère une modification du rapport Zn/Al entre 3 et 2 en fonction du temps. En effet, dans le cas des phases préparées par coprécipitation, la distance angulaire de la raie (110) passe d'environ  $59,81$  à  $60,42^\circ$   $2\theta$ , lorsque le rapport Zn/Al varie entre 3 et 2.

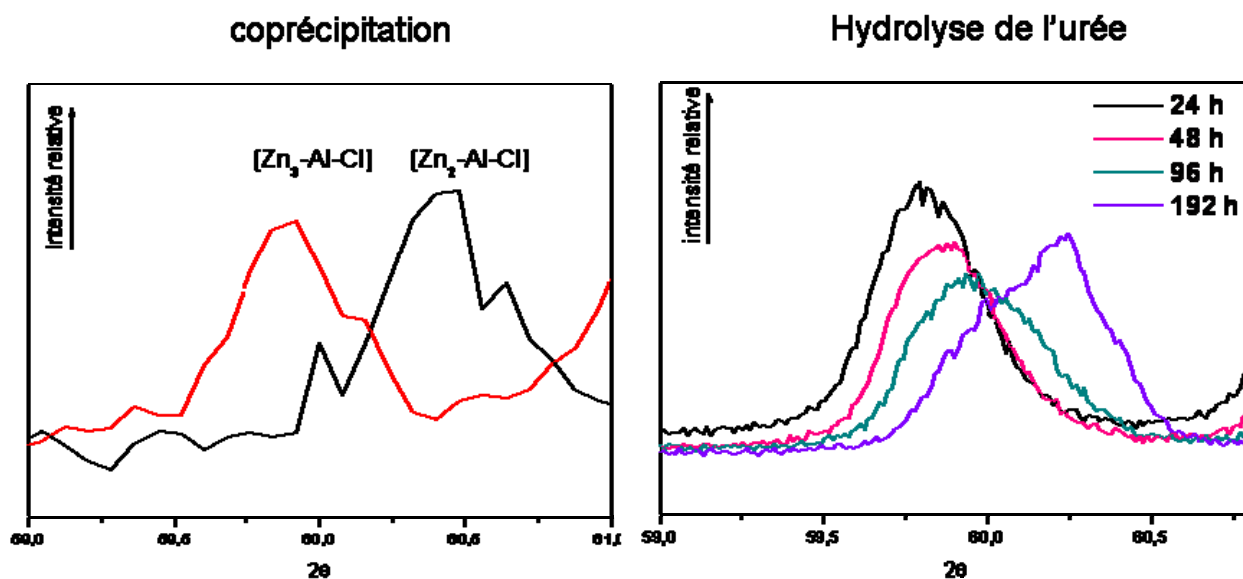
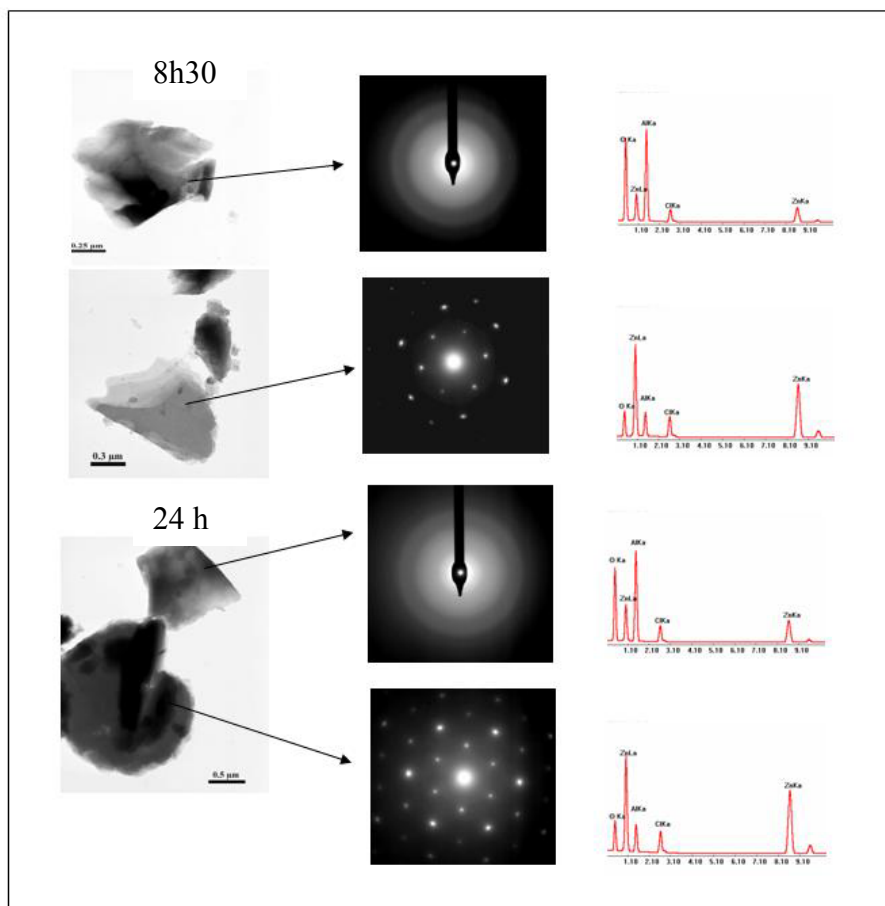


Figure 4 : Déplacement des raies de diffraction (110) en fonction du rapport R pour les phases préparées par coprécipitation par hydrolyse de l'urée à différents temps de réaction.

Solides prélevés entre 8h30 et 24h

Les échantillons 1 (8h30) et 3 (24h) ont été examinés par microscopie électronique à transmission couplée avec la technique EDX (Figure 5) afin d'identifier à l'échelle nanométrique les phases en présence. Les résultats indiquent la présence de deux composés, une phase riche en aluminium et une phase constituée de zinc et d'aluminium avec des rapports  $Zn^{2+}/Al^{3+}$  compris entre deux et trois. Les particules majoritairement composées d'aluminium sont amorphes et présentent des morphologies mal définies. Cette phase évolue peu avec le temps et diminue en quantité. Les composés mixtes ( $2 < Zn^{2+}/Al^{3+} < 3$ ) montrent des particules mieux définies dont la cristallinité et la taille augmentent avec le temps. Les diffractogrammes électroniques réalisés sur la face principale des plaquettes révèlent un réseau cristallin hexagonal. La diffraction électronique corrobore les résultats des diffractogrammes des rayons X sur l'organisation structurale de l'HDL.

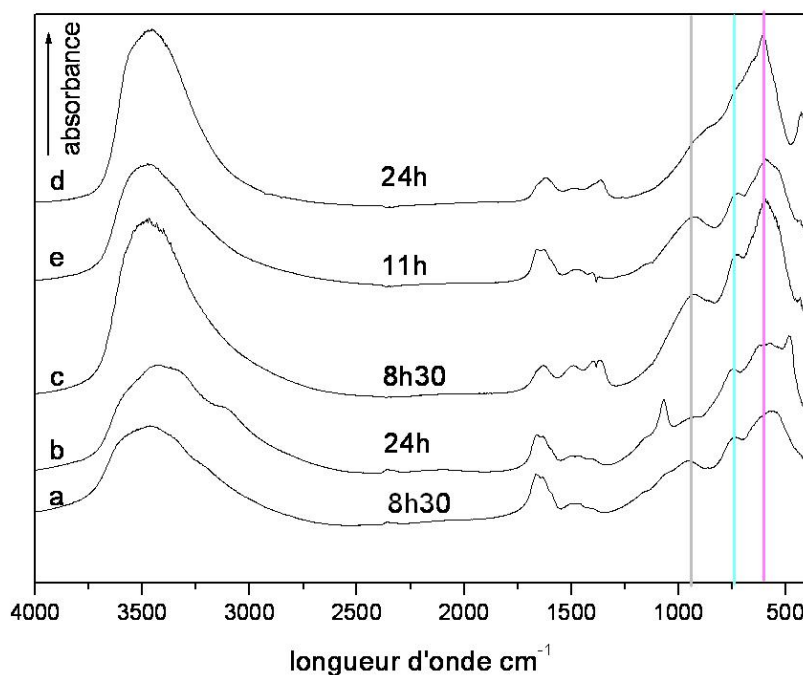


**Figure 5 : Clichés MET, analyses EDX et diffractogrammes électroniques des phases préparées à 8h30 et à 24h**

Le spectre infrarouge de l'échantillon 3 (24h) est caractéristique d'une phase HDL  $[\text{Zn-Al-Cl}]^{18}$  (Figure 6). Il montre typiquement une forte absorbance à  $3450\text{ cm}^{-1}$  et une plus faible à  $1620\text{ cm}^{-1}$  qui correspondent aux bandes de vibrations de valence de l'eau intercalée,  $\nu_{\text{OH}}$  et  $\delta_{\text{HOH}}$  respectivement. Cette région du spectre infrarouge est caractéristique des interactions entre les groupements OH, les molécules  $\text{H}_2\text{O}$  et les anions de l'interfeuille.

Les bandes observées dans la région de plus faibles fréquences correspondent aux bandes de vibrations de la matrice et peuvent être attribuées aux vibrations M-O ( $841$  à  $647\text{ cm}^{-1}$ ) et O-M-O ( $427\text{ cm}^{-1}$ ). Les fréquences et les largeurs de ces bandes de vibration dépendent de la composition en cations divalents et trivalents et du degré d'ordre des feuillet. L'allure du spectre de l'échantillon 3 suggère un rapport Zn/Al de 3. Contrairement aux spectres IR des phases  $R = 2$  qui présentent une structure plus rigide, le spectre de l'échantillon 3 montre des bandes de vibration du réseau moins bien définies. En outre, l'intensité de la raie O-M-O inférieure à celle la bande de vibration M-O appuie cette hypothèse.

Pour les spectres des échantillons 1 et 2, la raie à  $427\text{ cm}^{-1}$  est de faible intensité et les bandes entre  $500$  et  $1000\text{ cm}^{-1}$  sont nettement élargies, indiquant une mauvaise organisation du feuillet HDL. Deux autres bandes vers  $950\text{ cm}^{-1}$  et  $740\text{ cm}^{-1}$  ont été observées mais ne correspondent pas aux bandes de la phase HDL puisqu'elles tendent à disparaître lors de sa formation.

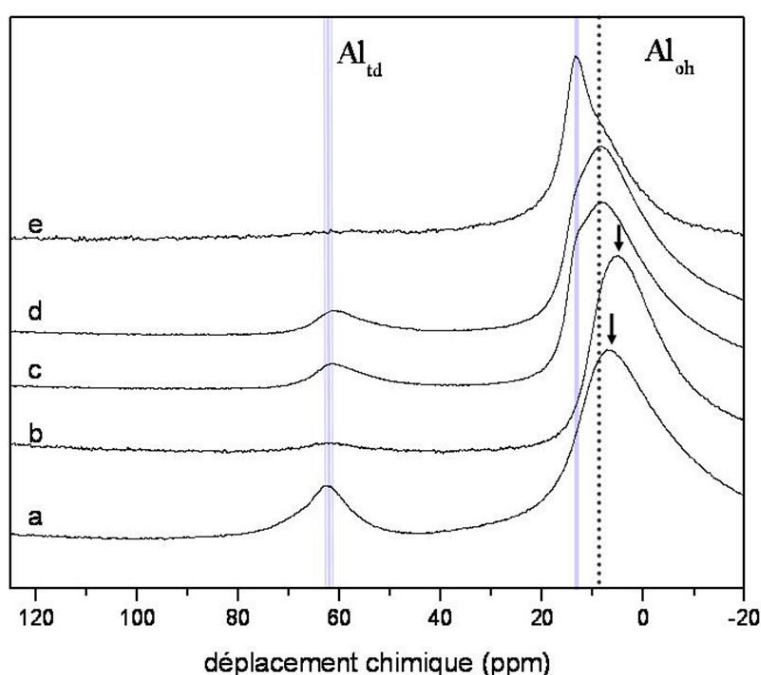


**Figure 6 : Spectroscopie infrarouge de la boehmite a) 8h30, b) 24h et des échantillons  $[\text{Zn-Al}]$  c) 1 (8h30) d) 2 (11h) , e) 3 (24h)**

<sup>18</sup> V. Rives, Layered double hydroxides: Present and Future, Nova Science Publishers, Inc., 2003, 139-193

La comparaison des spectres IR à ceux des hydroxydes d'aluminium préparés dans les mêmes conditions, montre des similitudes utiles à l'analyse. Les diffractogrammes X des produits obtenus à 8 heures 30 et 24 heures de synthèse correspondent à un mélange de phases amorphe et cristallisée. La spectroscopie infrarouge révèle la présence des bandes à  $950\text{ cm}^{-1}$  et  $740\text{ cm}^{-1}$  pour le matériau amorphe. Le prolongement de l'hydrolyse favorise la cristallisation d'une phase boehmite, caractérisée en FTIR par les bandes à 3118, 1158 et  $1068\text{ cm}^{-1}$  <sup>19,20</sup>. Il en résulte que les formations des phases HDL et boehmite mettent en jeu le même intermédiaire réactionnel, un hydroxyde d'aluminium amorphe. Il est important de noter qu'à 24h, la carbonatation de la phase HDL  $[\text{Zn-Al-Cl}]$  n'a pas encore eu lieu (absence de la vibration d'élongation C-O,  $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$  à  $1360\text{ cm}^{-1}$ ).

Afin d'identifier plus précisément les phases à base d'ions  $\text{Al}^{3+}$ , les spectres RMN MAS de l' $^{27}\text{Al}$  ont été enregistrés pour ces phases solides et comparés à ceux des composés issus de la précipitation d' $\text{Al}^{3+}$  pur (Figure 7).



**Figure 7 : RMN  $^{27}\text{Al}$  de la boehmite a) 8h, b) 24h et HDL c) 8h d) 11h, e) 24h**

Les échantillons 1 et 2 présentent deux bandes de résonance larges significatives d'un composé amorphe: une raie à 61,4 ppm caractéristique des aluminiums tétraédriques ( $\text{Al}_{\text{Td}}$ ) et une à 8,4 ppm, région des aluminiums en coordinence 6 ( $\text{Al}_{\text{Oh}}$ ). Un épaulement vers 13 ppm est observé. Au cours de la synthèse, le pic majoritaire, large à 8,4 ppm diminue au profit de

<sup>19</sup> U. Janasovits, G. Ziegler, U. Scharf, A. Wokaun, J. Non-Crystalline Solids, 210, 1997, 1-13

<sup>20</sup> K. Sinko, R. Mezei, J. Rohonczy, P. Fatzl, Langmuir, 15, 1999, 6631-6636

la résonance à 13 ppm. La phase HDL, préparée au bout de 24 heures, présente une raie principale à 13 ppm et un épaulement vers 9 ppm. La disparition du pic à 61 ppm correspond à la conversion de l'aluminium tétraédrique en aluminium octaédrique. Le déplacement chimique à 13 ppm est caractéristique<sup>21</sup> de l'Al pseudo-octaédrique (symétrie D<sub>3d</sub>) des feuillets HDL pour une condensation du type Al(OH-Zn)<sub>6-x</sub>(OH-Al)<sub>x</sub>. La présence d'ions Zn<sup>2+</sup> dans l'environnement proche de l'Al (13.0 ppm) conduit à un déplacement chimique vers les bas champs, par rapport à Al(OOH) (5,3 ppm). Le Tableau 2 récapitule les déplacements chimiques de l'aluminium pour les différentes phases.

**Tableau 2 : Déplacements chimiques RMN MAS <sup>27</sup>Al des atomes d'Al<sup>3+</sup> pour les phases précipitées par hydrolyse de l'urée**

Phase	$\delta\text{Al}_{\text{Td}}$ ppm	$\delta\text{Al}_{\text{Oh}}$ ppm		
HDL – 8h30	61,4	13	8,4	-
HDL – 11h	61,4	13	8,4	-
HDL – 24h	61,4	13	8,4	-
Boehmite-8h	62,8	-	-	7,2
Boehmite-24h	62,8	-	-	5,3

L'Al<sup>3+</sup> tétraédrique apparaît donc comme une espèce réactive présente dès le début de la synthèse et qui intervient dans la conversion des hydroxydes d'aluminium en phases mixtes HDL. L'hypothèse que l'aluminium tétraédrique appartienne à l'espèce [Al(OH)<sub>4</sub>]<sup>-</sup> est peu probable. En effet, cette espèce a été identifiée seulement pour des pH très basiques et montre un déplacement chimique<sup>22</sup> vers 80 ppm pour la RMN de l'<sup>27</sup>Al.

D'après la littérature<sup>19,23</sup>, l'observation simultanée des raies à 61,4 et 8,45 ppm met en évidence la présence du polycation d'aluminium Al<sub>13</sub>, [AlO<sub>4</sub>Al<sub>12</sub>(OH)<sub>24</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>12</sub>]<sup>7+</sup>. Ce composé, de structure type polycations de Keggin, est constitué d'un aluminium tétraédrique (Al<sub>Td</sub>) entouré par douze aluminiums octaédriques (Al<sub>Oh</sub>) (Figure 8).

<sup>21</sup> S. Velu, V. Ramkumar, J. Material Science, 32, 1997, 957

<sup>22</sup> J.W. Akitt, J. Chem. Soc, Dalton Trans., 1984, 147-148

<sup>23</sup> W. H. Casey, coll, Geochimica et Cosmochimica Acta, 64, 17, 2000, 2951-2964

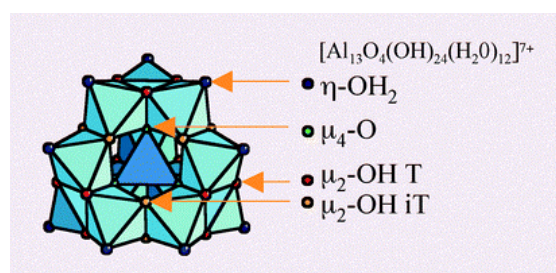


Figure 8 : Structure<sup>24</sup> du polycation [AlO<sub>4</sub>Al<sub>12</sub>(OH)<sub>24</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>12</sub>]<sup>7+</sup>

De plus, lors de la neutralisation acido-basique d'une solution de sels d'aluminium, la précipitation d'une phase transitoire (amorphe, gélatineuse et transparente) résultant de l'agrégation de cations Al<sub>13</sub> a été décrite dans la littérature<sup>25</sup>. Il a été montré que le pic Al<sub>Td</sub> disparaît progressivement au cours de la cristallisation de Al(OH)<sub>3</sub>. Nous faisons la même observation pour la précipitation des cations Al<sup>3+</sup> par hydrolyse de l'urée.

Pour résumer, la précipitation d'une phase d'hydroxyde double lamellaire passe par l'intermédiaire d'une phase amorphe riche en aluminium présentant les deux coordinences octaédrique et tétraédrique. Cette phase semble être constituée d'oligomères d'aluminium Al<sub>13</sub><sup>26</sup> consommés au fur et à mesure que le cation Zn<sup>2+</sup> réagit pour former la phase HDL.

### Solides prélevés entre 48h et 192h

Au delà de 24 heures de synthèse, les matériaux présentent une meilleure cristallinité comme le révèlent les diffractogrammes de rayons X (Figure 4). Les paramètres de maille, affinés dans le système Hexagonal/R-3m, sont récapitulés dans le Tableau 3. Le paramètre *d* calculé diminue avec le temps de réaction et passe de 7,78 Å à 7,57 Å. Ces distances correspondent aux distances interlamellaires des HDL chlorures et carbonates, respectivement.

Tableau 3 : Paramètres de mailles

Échantillons	c calculé (Å)	a calculé (Å)	d calculé (Å)
3 (24 h)	23.34 (4)	3.075 (2)	7.78 (4)
4 (48 h)	23.22 (6)	3.062 (3)	7.74 (6)
5 (96 h)	22.91 (8)	3.071 (9)	7.63 (8)
6 (192 h)	22.72 (5)	3.070 (7)	7.57 (5)

Parallèlement, la raie de diffraction correspondant à la réflexion (006) s'élargit à partir de 48 heures. Afin d'améliorer la résolution expérimentale dans le domaine angulaire des bas  $\theta$ , les

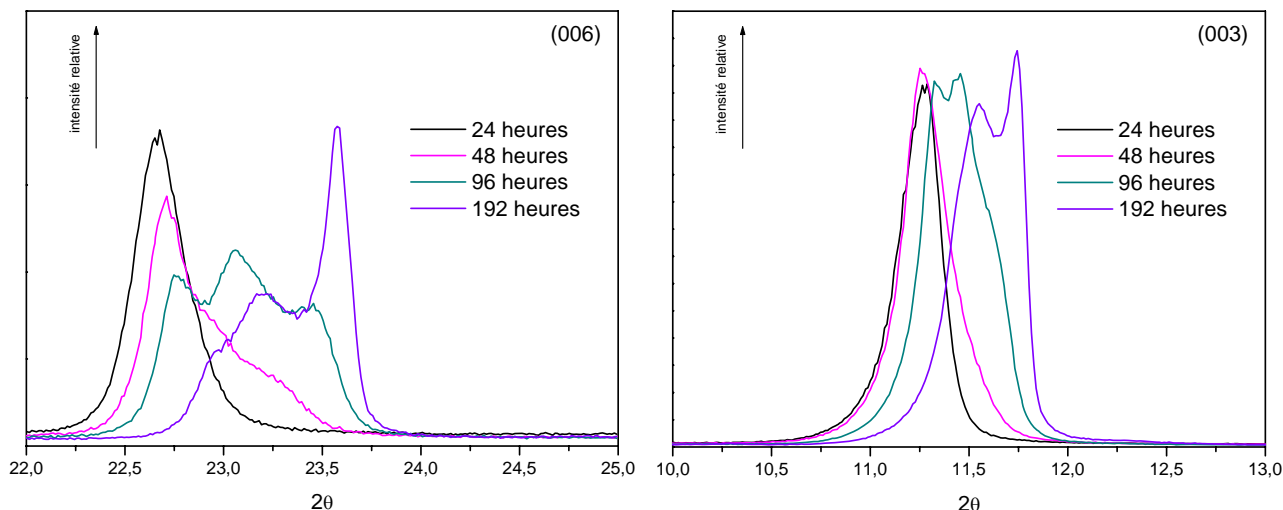
<sup>24</sup> L. Allouche, F. Taulelle, Chemical Communications, 16, 2003, 2084-2085

<sup>25</sup> J. P. Jolivet : De la solution à l'oxyde : condensations des cations en solution aqueuse, savoirs actuels, interéditions/ CNRS, éditions.

<sup>26</sup> M.L. Occeli, A. Auroux, G. J. Ray, Microporous and Mesoporous Materials, 39, 2000, 43-56



diffractogrammes ont été enregistrés dans de nouvelles conditions de pas angulaire et de temps d'acquisition (annexe 1. 7). Les diffractogrammes dans le domaine angulaire des réflexions (003) et (006) sont présentés sur la Figure 9 et les données structurales dans le Tableau 4.



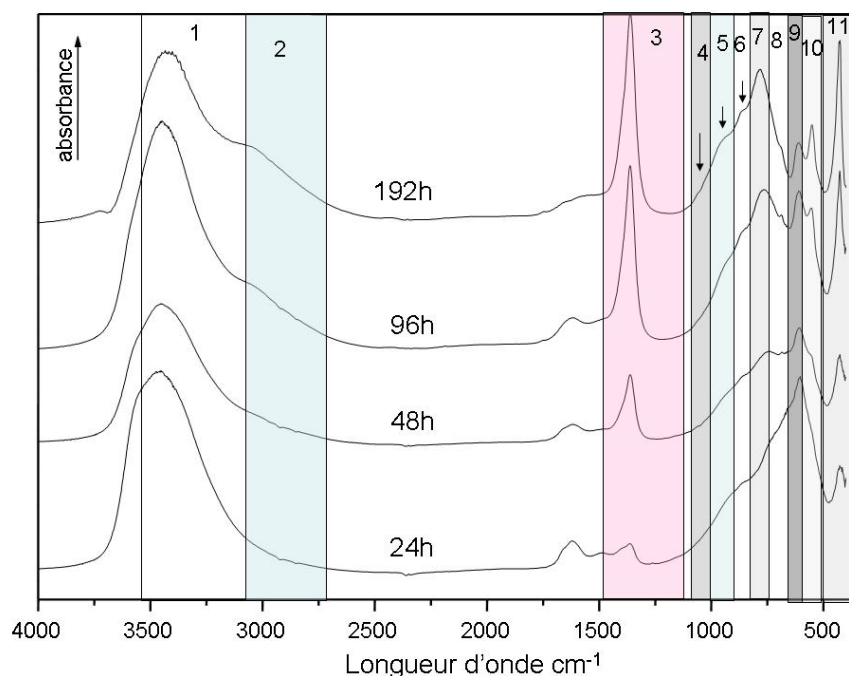
**Figure 9 : Raies de diffraction (003) et (006) des HDL préparés entre 24 et 192h**

**Tableau 4 : Distances observées pour les réflexions (003) et (006)**

Echantillons	(hkl)	1 <sup>er</sup> pic		2 <sup>nd</sup> pic		3 <sup>ème</sup> pic		4 <sup>ème</sup> pic	
		d (Å)	I/I <sub>0</sub> %	d (Å)	I/I <sub>0</sub> %	d (Å)	I/I <sub>0</sub> %	d (Å)	I/I <sub>0</sub> %
3 (24h)	(003)	7.84	100						
	(006)	3,92	26						
4 (48h)	(003)	7.85	100	7.81	87				
	(006)	3.91	20	3.86	9	3.82	5		
5 (96h)	(003)	7.80	98	7.73	98	7.58	48		
	(006)	3.90	14	3.85	16	3.83	13	3.78	11
6 (192h)	(003)	7.73	61	7.65	86	7.53	100		
	(006)	3.77	25	3.83	11				

Les résultats présentés ici sont particulièrement originaux car ils montrent l'évolution structurale de la phase HDL au cours du processus simultané de croissance cristalline et d'échange anionique  $\text{Cl}^-/\text{CO}_3^{2-}$ . En effet, le degré de cristallinité élevé des phases HDL obtenues par le procédé de précipitation par hydrolyse thermique de l'urée permet une résolution fine des structures des composés intercalés par différent taux d'anions chlorures et carbonates. La présence de plusieurs raies de diffraction (00l) bien définies, caractéristiques de distances interlamellaires démontre que le processus d'échange intra-structural est progressif et met en jeu des populations d'anions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  co-intercalés en quantité variable. L'intercalation des ions carbonates commence après 24 h, la raie (003) se différenciant à 96h. Le phénomène de séparation des raies est encore plus net au niveau des réflexions (006). Costantino et Coll<sup>27</sup> ont également observé, lors de la titration d'une phase HDL carbonatée par une solution d'acide chlorhydrique, une diversité de pics (006) correspondant à des régions riches en ions chlorures et des régions riches en carbonates.

Les spectres infrarouge (Figure 10) de ces composés montrent l'augmentation de la raie  $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$  à  $1360\text{ cm}^{-1}$  (région 3) et de la bande de valence des  $\text{H}_2\text{O}$  interlamellaires, à  $3060\text{ cm}^{-1}$ , liées aux anions  $\text{CO}_3^{2-}$  (région 2).



**Figure 10 : Spectroscopie infrarouge des échantillons 3, 4, 5 et 6**

Les fortes modifications des bandes de vibration du réseau entre  $400$  et  $1000\text{ cm}^{-1}$  sont représentatives de cette transformation  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}] \rightarrow [\text{Zn}_2\text{-Al-CO}_3]$ . De plus, l'affinement des

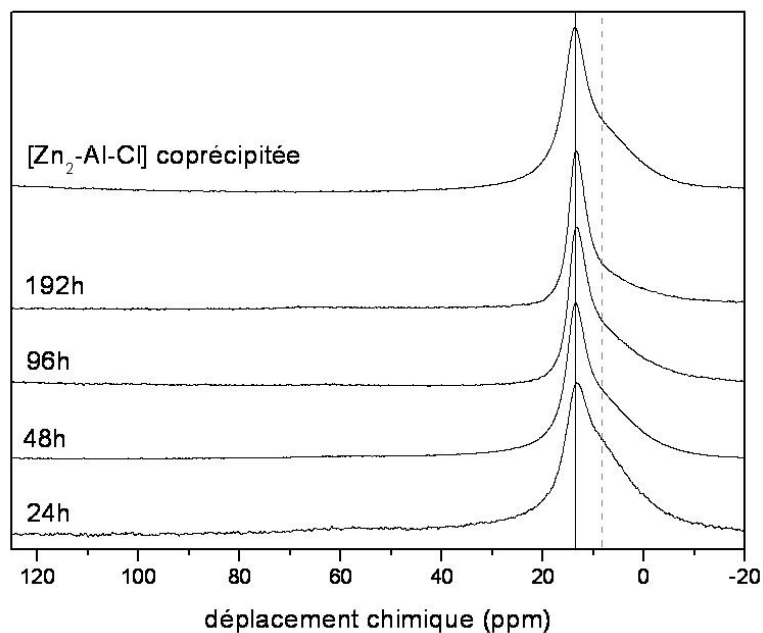
<sup>27</sup> U. Costantino, M. Nocchetti, Physical Review B, 61 (17), 2000, 11348-11358

raies dans ce domaine est provoqué par une meilleure organisation structurale des feuillets en étroite relation avec la structuration des domaines interlamellaires. Le Tableau 5 identifie les différents déplacements lors du passage d'une phase chlorée à carbonatée.

**Tableau 5: Attributions des fréquences de vibrations<sup>28</sup>**

Bandes	Déplacement cm <sup>-1</sup>	Vibrations de réseau	Anions	Bandes	Déplacement cm <sup>-1</sup>	Vibrations de réseau	Anions
1	3445	$\nu_{OH}$		7	780	$\nu_{M-O}$	$CO_3^{2-}$
2	3047	$H_2O-CO_3^-$	$CO_3^{2-}$	8	690	$\nu_{4 CO_3}$	$CO_3^{2-}$
3	1360	$\nu_{3 CO_3}$	$CO_3^{2-}$	9	606	$\nu_{M-O}$	$Cl^-$
4	1060	$\nu_{1 CO_3}$	$CO_3^{2-}$	10	551	$\nu_{M-O}$	$CO_3^{2-}$
5	942	$\nu_{M-O}$	$CO_3^{2-}$	11	427	$\delta_{O-M-O}$	
6	870	$\nu_{2 CO_3}$	$CO_3^{2-}$				

Les spectres RMN CP-MAS de l'<sup>27</sup>Al pour ces différentes phases ont été comparés avec celui d'une phase [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl] préparée par coprécipitation standard (Figure 11).



**Figure 11 : RMN <sup>27</sup>Al des échantillons 3, 4, 5 et 6 et d'une phase [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl] de référence**

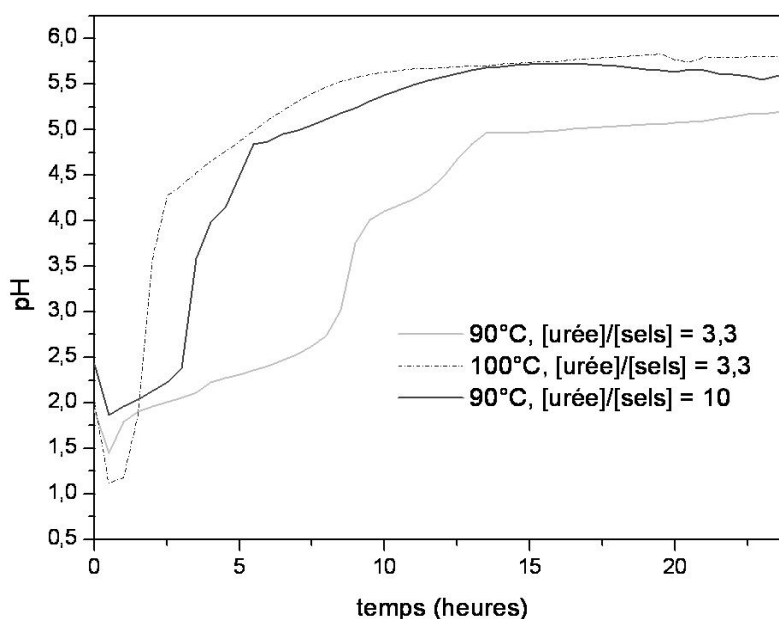
<sup>28</sup> The infrared Spectra of minerals, Mineralogy Society, edited by V. C. Farmer,

Le pic à 13 ppm s'affine et devient majoritaire à 192 h de réaction avec l'amélioration de la cristallinité et l'augmentation de la symétrie locale de l'aluminium. L'épaule large à basse fréquence (8,4 ppm) peut avoir plusieurs origines. D'après la littérature, il correspondrait à une distribution large d'environnements chimiques proche des hydroxydes d'aluminium amorphes et probablement dû soit à des résidus d'Al(OH)<sub>3</sub> soit à des particules [Zn-Al] de très petites tailles. Toutefois, il faut noter que la symétrie hexagonale autour des noyaux d'aluminium génère une décomposition du tenseur de déplacement chimique isotrope en 3 composantes anisotropes  $\sigma_{xx}$ ,  $\sigma_{yy}$  et  $\sigma_{zz}$  qui provoque une dissymétrie du signal.

### *III.2.2 Effet de la température d'hydrolyse de l'urée et du rapport [urée]/[sels]*

Les hydroxydes doubles lamellaires ont été préparés dans les mêmes conditions que l'échantillon 3 pour un temps de réaction de 24 heures. Cependant, l'hydrolyse de l'urée a été effectuée à 100°C pour un rapport [urée]/[sels métalliques] de 3,3 et à 90°C pour un rapport [urée]/[sels métalliques] de 10,0. Les phases obtenues sont nommées respectivement échantillons 7 et 8.

L'augmentation de la température accélère la décomposition de l'urée et entraîne l'élévation du pH final, comme on peut le voir sur les courbes de pH (Figure 12). A 100°C, la production de base dans le milieu est brutale et les étapes de précipitations successives ne sont plus différenciées dans le temps. L'utilisation d'une quantité supérieure d'urée conduit aux mêmes effets sur l'évolution des courbes de pH qu'une élévation de la température de réaction. Dans les deux cas le plateau de pH est atteint pour des temps de réaction plus courts (au bout de 7h30 et 13h respectivement pour T = 100°C et [urée]/[sels] = 10), favorisant probablement la superposition des cinétiques de nucléation et de croissance cristalline.



**Figure 12 : Evolution du pH en fonction du temps à différentes températures et différents rapports [urée]/[sels].**

Les analyses chimiques (Tableau 6) montrent des différences entre les composés préparés à 90°C et 100°C. La phase obtenue à 100°C possède un rapport  $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  plus élevé supposant que la présence d'hydroxyde d'aluminium amorphe est amoindrie. Sa concentration en carbonate est plus importante alors que la quantité d'ions  $\text{Cl}^-$  est plus faible. L'effet de la température tend à accélérer la formation de la phase  $[\text{Zn-Al-CO}_3]$ . Pour des rapports [urée]/[sels métalliques] différents, les phases 3 et 8 présentent des rapports molaires pratiquement identiques et correspondent à des phases HDL riches en ions  $\text{Cl}^-$ . Par contre, la quantité d'azote est plus importante pour l'échantillon 8. Le spectre infrarouge (Figure 13) de cette phase révèle la présence plus marquante de l'urée avec les raies attribuées à 1685, 1627, 1460 et 1151  $\text{cm}^{-1}$ . On peut remarquer que la base retard se fixe sur le matériau puisqu'elle est toujours présente après plusieurs lavages. L'excès d'urée n'est pas totalement décomposé après 24 heures de synthèse et son adsorption sur la phase HDL est notable.

**Tableau 6 : Analyses chimiques des phases (fraction molaire)**

Echantillons	T°C	[Urée]/[sels]	$\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ théo	$\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ exp	$\text{Cl}^-/\text{Al}^{3+}$	$\text{CO}_3^{2-}/\text{Al}^{3+}$	$(\text{Cl}^- + 2\text{CO}_3^{2-})/\text{Al}^{3+}$	% N
3	90	3,3	2	1.60	0,64	0,05	0,74	0,28
7	100	3,3	2	1.89	0,46	0,15	0,76	0,1
8	90	10,0	2	1.68	0,67	0,03	0,73	3,6

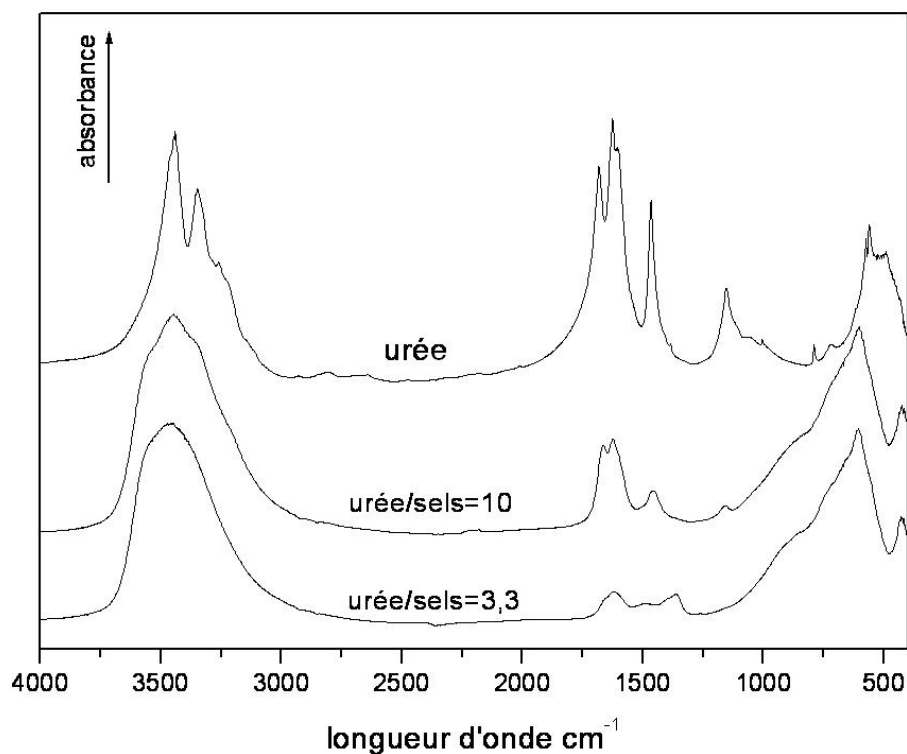


Figure 13 : Spectres infrarouge des échantillons 3 , 8 et de l'urée

D'après les diffractogrammes de rayons X (Figure 14), les phases 3 et 7 présentent des cristallinités similaires. Les paramètres de maille  $a$ , confirment des rapports  $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  proches dans les structures HDL.

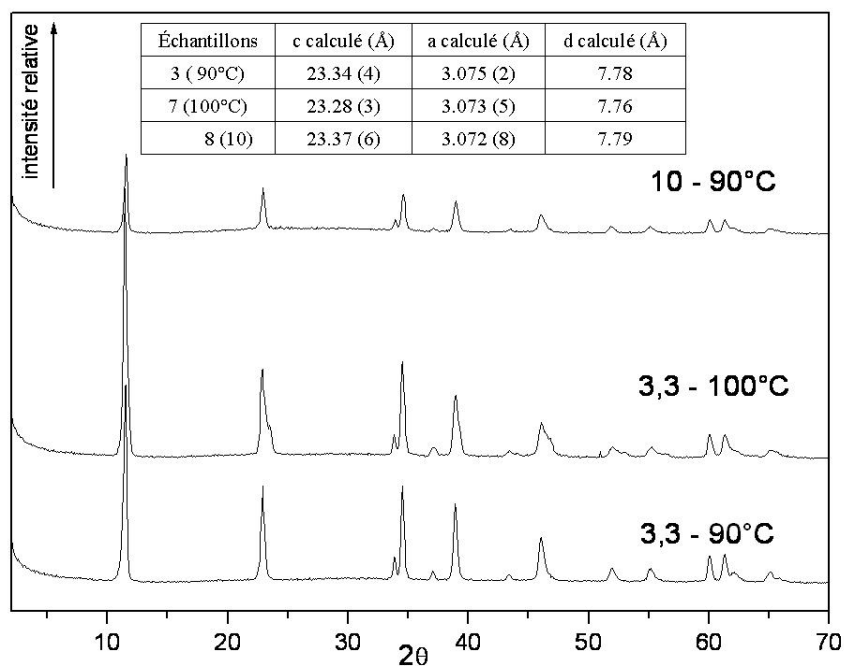
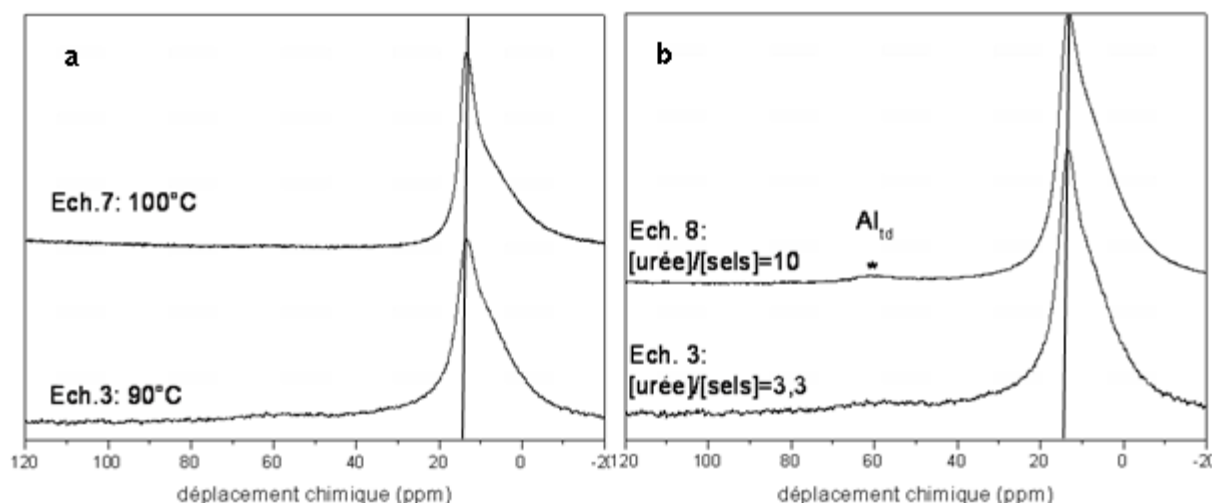


Figure 14 : Diffractogrammes des rayons X des échantillons 3, 7 et 8 et tableau des paramètres de maille

Par contre le dédoublement des raies de diffraction (003) et (006) et la présence d'une bande intense à 1360 cm<sup>-1</sup> sur le spectre infrarouge montrent que l'échange Cl<sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> est plus avancé à 100°C, comme pour les échantillons 4 (48h) et 5 (96h). Par contre pour un rapport [urée]/[sels] croissant, la cristallinité de la phase (8) diminue. La distance interlamellaire est identique quel que soit le taux d'urée et confirme les analyses chimiques sur la formation d'une phase HDL majoritairement chlorée.

La RMN de l'<sup>27</sup>Al montre la présence de l'intermédiaire réactionnel contenant de l'Al<sup>3+</sup><sub>Td</sub> (61,4 ppm) pour les deux phases préparées à 90°C (3 et 8) alors que cette espèce a disparu après 24h de réaction à 100°C (Figure 15).



**Figure 15 : RMN <sup>27</sup>Al des échantillons préparés en fonction a) de la température (échantillons 3 et 7) et b) de [Urée]/[sels] (échantillons 3 et 8)**

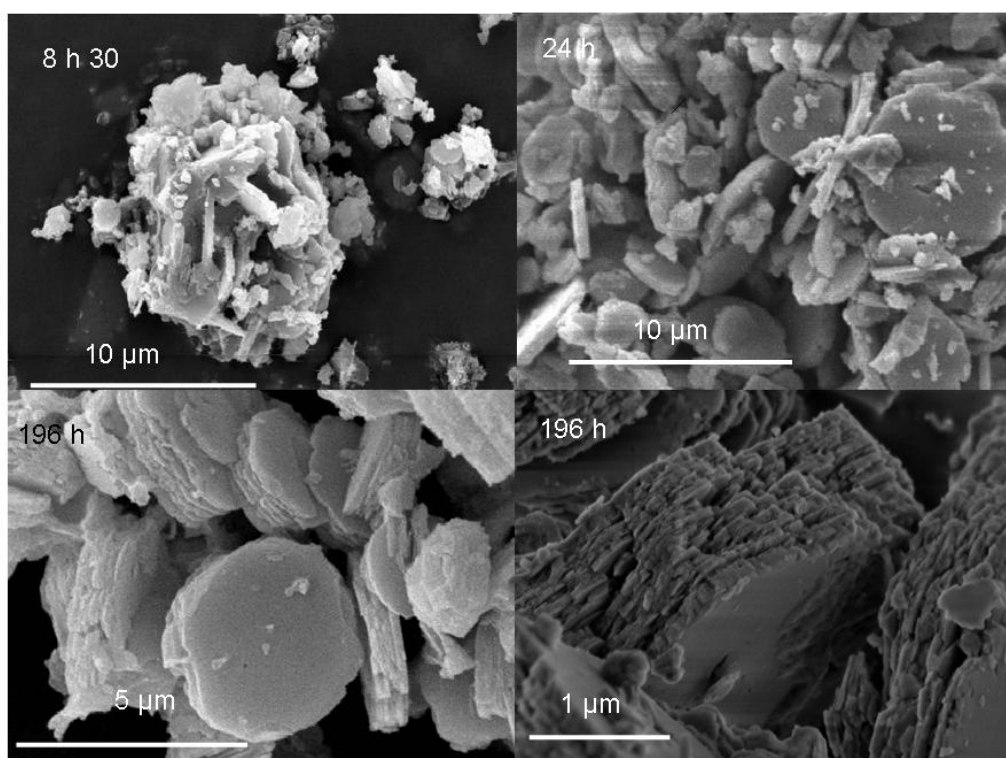
La raie principale avec épaulement pointé à 9 ppm est identique quel que soit le taux d'urée, alors qu'elle s'affine nettement pour la phase préparée à 100°C. L'environnement des ions Al<sup>3+</sup> coordonnés par 6 ligands se modifie. En outre, le changement de l'anion entre les feuillets entraîne aussi une différence au niveau de l'environnement local de l'aluminium. L'observation d'un pic de résonance à 13 ppm quelles que soient les conditions de préparation des phases HDL [Zn-Al] semble indiquer que la composition chimique Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> est pratiquement imposée après 24h de précipitation.

### III.3 Etude des propriétés morphologiques

Une étude par microscopie électronique à balayage a été réalisée sur divers échantillons préparés pour différentes conditions de préparation.

Les particules de  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]$  présentent une morphologie en forme de disque et des diamètres supérieurs au micron. L'aggrégation se fait par les faces principales et conduit à un empilement suivant l'axe perpendiculaire aux faces.

La Figure 16 montre l'évolution morphologique des phases en fonction du temps.



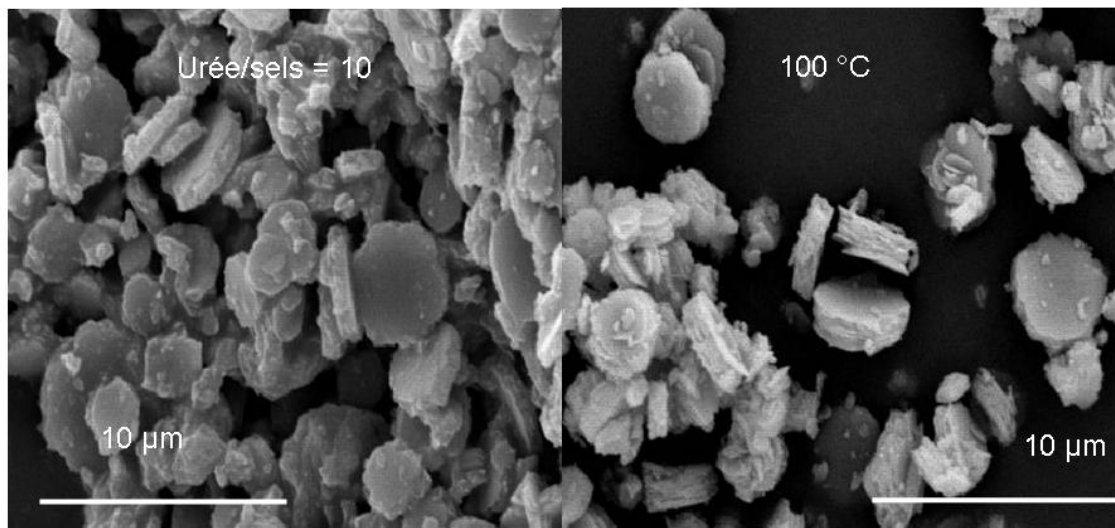
**Figure 16 : Clichés MEB des phases préparées à a) 8h30, b) 24h , c) et d) 196 h**

Dans les conditions standards ( $90^\circ\text{C}$ , urée/sels=3,3), l'apparition de plaquettes isolées se manifeste après 24 heures de synthèse (Figure 16.b). Le cliché réalisé sur l'échantillon 1 révèle un agrégat indiquant le début de formation des particules rondes. Au bout de 24h, ces particules se détachent. Lorsque les particules sont isolées (Figure 16. b), la taille moyenne dépasse les  $3\ \mu\text{m}$  et leur épaisseur est approximativement de  $600\ \text{nm}$ , conduisant à un facteur de forme de 5. Les dimensions latérales augmentent faiblement avec le temps d'où une faible amélioration de la cristallinité. Le diamètre des disques devient de plus en plus uniforme. Par contre l'épaisseur des plaquettes continue de croître jusqu'à la fin de la synthèse et atteint une



épaisseur proche de 1  $\mu\text{m}$ . En réalisant un grandissement sur les faces latérales des particules, on observe que l'augmentation se manifeste par un empilement de plaquettes d'épaisseur avoisinant 100 nm (Figure 16. d).

En accélérant la vitesse d'hydrolyse de l'urée, la taille des particules diminue alors que l'épaisseur évolue peu (Figure 17). Le tableau révèle les dimensions des particules élaborées à 100 °C et pour un rapport urée/sels = 10 (Figure 17).



Paramètres	Diamètre du disque	Epaisseur
Urée/sels = 10	$\approx 2 \mu\text{m}$	$\approx 1 \mu\text{m}$
T = 100 °C	$\approx 2,5 \mu\text{m}$	$\approx 1,22 \mu\text{m}$

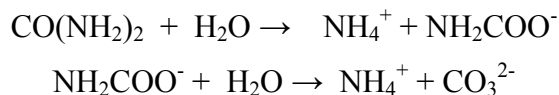
**Figure 17 : Clichés MEB et tailles des particules des échantillons 7 et 8**

La taille des particules<sup>7</sup> est fonction de la concentration et du nombre de germes selon l'équation  $L = (Cv/8N)^{1/3}$  où C est la concentration, v le volume moléculaire et N le nombre de cristaux. Lorsque la vitesse d'hydrolyse est accélérée, provoquée par une augmentation de la température ou par une concentration en urée plus élevée, la vitesse de nucléation est favorisée. Par conséquent, le nombre de nuclei augmente et d'après l'équation la taille des particules diminue. Après nucléation, la vitesse d'hydrolyse de l'urée n'est toutefois pas suffisante pour générer la formation d'une nouvelle série de germes; la croissance des particules est alors favorisée.

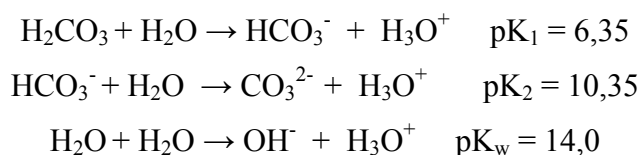
### III.4 Discussion sur la formation de la phase HDL [Zn-Al]

Le procédé de précipitation des Hydroxydes Doubles Lamellaires par hydrolyse thermique de l'urée met en jeu un nombre important d'espèces en solution et d'équilibres chimiques correspondants :

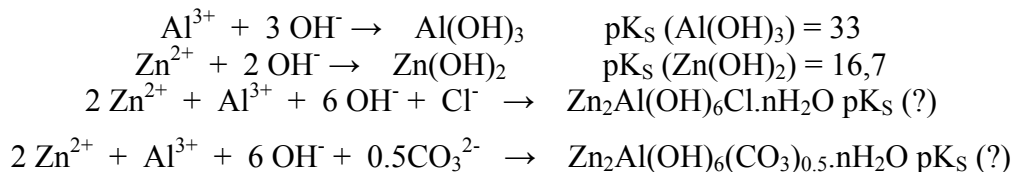
1) la décomposition de l'urée :



2) les équilibres de dissociation des acides :



3) les précipitations des hydroxydes métalliques :



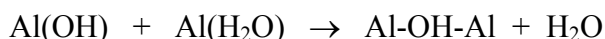
La détermination des concentrations des espèces en solution devrait nous permettre de proposer un mécanisme de formation de la phase HDL. Cela passe avant tout par la détermination des rapports  $[\text{OH}^-]/[\text{Al}^{3+}]$  et  $[\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}]$ . Malheureusement, la relation  $[\text{OH}^-] = f(\text{pH})$  n'est pas facile à déterminer du fait de la difficulté à quantifier les espèces dans un milieu hétérogène et de la multiplicité des équilibres chimiques en présence. Par ailleurs, la spéciation de  $\text{Al}^{3+}$  en solution aqueuse reste mal identifiée pour ces milieux complexes et d'autres équilibres chimiques non identifiés peuvent intervenir.

Cependant, l'analyse des courbes de pH en fonction du temps nous permet de tirer un certain nombre de conclusions. Lors de la réaction d'hydrolyse de l'urée, le pH de la solution s'élève. L'augmentation du pH est provoquée par la libération des ions  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{OH}^-$  issus de la décomposition de la base. Certains facteurs peuvent contrôler la vitesse d'hydrolyse de l'urée. En augmentant la température ou la concentration en urée, la libération d'ions  $\text{OH}^-$  est accélérée. Les réactions de condensation des hydroxydes métalliques, moins rapides, n'ont pas le temps de les consommer, la valeur de pH augmente brutalement. La précipitation a lieu dans des conditions de concentrations élevées en ions  $[\text{OH}^-]$ . Dans le cas de l'hydrolyse d'une

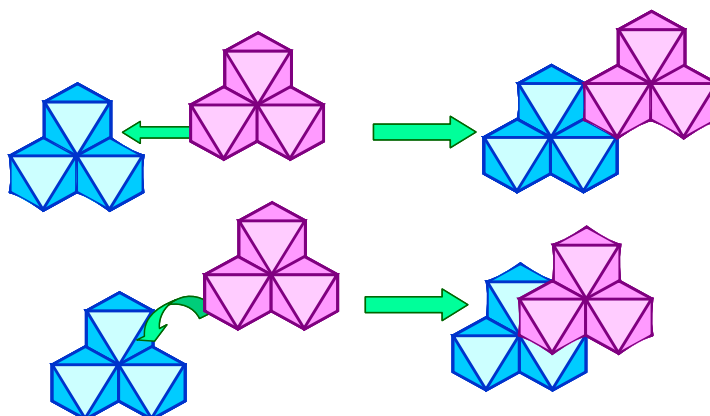
solution d'urée pure, le pH est tamponné par la présence des différentes espèces à une valeur constante d'environ 7,9.

Dans les conditions standards de synthèse utilisées ([sels] = 1M, [urée]/[sels] = 3,3 et T = 90°C), différentes étapes ont pu être observées. Lors de l'ajout des sels métalliques à la solution d'urée, la solution est acidifiée à pH~2,2. La précipitation des hydroxydes métalliques provient de la consommation des ions OH<sup>-</sup> par les cations qui forment alors des précurseurs de charge nulle, réactifs pour les réactions de condensation. Au cours de ces réactions de neutralisation, le pH de la solution se stabilise à des valeurs inférieures au pH d'hydrolyse de l'urée seule. La neutralisation procède par étape, les ions Al(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> réagissent en 1<sup>er</sup>, suivis des ions Zn(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>2+</sup>. Il se forme d'abord un gel riche précurseur de la phase boehmite (AlOOH). Les déplacements chimiques de la RMN <sup>27</sup>Al, à 61,4 ppm et 8,45 ppm, suggèrent la présence d'une espèce aluminate contenant respectivement des ions Al<sup>3+</sup> en environnement tétraédrique et octaédrique. La présence simultanée de ces deux environnements met en évidence la formation du polycation d'aluminium [AlO<sub>4</sub>Al<sub>12</sub>(OH)<sub>24</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>12</sub>]<sup>7+</sup>, (Al<sub>13</sub>), déjà proposée dans la littérature<sup>17, 23</sup>. Ce polycation provient de la condensation de 4 trimères [Al<sub>3</sub>(OH)<sub>7</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> et 1 monomère Al(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> pour un taux d'hydrolyse h/Al=2,33. Le mécanisme de condensation procède par des réactions d'olation, mettant en jeu des précurseurs aquo-hydroxo, catalysées par les ions H<sup>+</sup>, suivie d'une réaction d'oxolation :

:



A h > 2,46, on a précipitation d'une phase amorphe de pseudo-boehmite. A cette étape, Al<sub>Td</sub> est transformé en Al<sub>Oh</sub>. La densité de charge des ions Al<sup>3+</sup> favorise la dissociation acide par formation de groupements oxo. On évolue alors vers une phase oxo-hydroxo plutôt que vers une phase hydroxo pure de type Al(OH)<sub>3</sub>, bayerite ou gibbsite, obtenues généralement à des pH plus élevés.



**Figure 18: Réaction de condensation pour les phases de type a) brucite (ou HDL) et b) boehmite**

La réaction de condensation implique des associations de trimères  $[\text{Al}_3\text{O}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_9]^{4+}$  à  $90^\circ$  avec formation de ponts oxo (Figure 18).

En prolongeant l'hydrolyse de l'urée, et par conséquent l'élévation du pH, l'Hydroxyde Double Lamellaire se forme très rapidement. Vers un pH de 4, les oligomères de  $\text{Zn}^{2+}$ , principalement  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ , réagissent avec les polycations d'aluminium. La nucléation est rapide, la concentration de base dans le milieu est réduite considérablement. La condensation se fait là encore par des réactions d'olation. La phase [Zn-Al] reste encore minoritaire. Les diffractogrammes montrent un matériau peu cristallisé. L'hydrolyse de l'urée se poursuit à une vitesse relativement faible, les ions  $\text{OH}^-$  sont alors consommés avec les cations métalliques par la croissance cristalline des plaquettes. Dans les conditions d'hydrolyse lente de l'urée utilisée, la phase [Zn-Al-Cl] précipite en premier. Dans ces conditions de pH acide ( $\text{pH} < 4,5$ ), l'espèce carbonatée majoritaire est  $\text{HCO}_3^-$  ( $\text{pK}_{a1}(\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-) = 6,35$ ) et le rapport  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  reste largement supérieur à 1,0 car la température élevée en favorisant le dégazage de  $\text{CO}_2$  déplace l'équilibre vers la réduction de  $[\text{HCO}_3^-]$ . La loi d'action de masse favorise l'intercalation des ions chlorures. En fin d'hydrolyse, le pH dépasse 5,95 après 48 heures et atteint 6,8 à 192 heures, les ions carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) apparaissent dans la solution, leur grande affinité pour la structure HDL entraîne l'échange anionique des chlorures. Les différentes techniques de caractérisation (DRX, FTIR) révèlent l'intercalation progressive des carbonates dans le matériau. Le mécanisme d'intercalation met en évidence des domaines bien ordonnés contenant des quantités variables d'anions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  co-intercalés. Nous n'avons pas mis en évidence ici d'effets de stade comme l'ont montré D. O'Hare et coll<sup>29</sup> pour la co-intercalation d'anions organiques dans les phases [Li-Al<sub>2</sub>].

<sup>29</sup> A. M. Fogg, J. S. Dunn, D. O'Hare, Chem. Mater., 10, 1998, 356-360

En augmentant la quantité d'urée en solution, on pouvait s'attendre à favoriser la formation de l'HDL. Or, l'excès d'urée provoque son adsorption à la surface des cristallites en construction et empêche l'obtention d'une phase HDL pure et idéalement cristallisée. Les caractérisations effectuées sur le matériau révèlent la présence d'une quantité mineure d'hydroxyde d'aluminium amorphe et un abaissement de la cristallinité de l'HDL. Le matériau préparé à 100°C montre une cristallinité légèrement inférieure à celle de la phase préparée dans les mêmes conditions mais à 90°C et une pureté plus prononcée. L'augmentation de la température favorise la carbonatation de l'HDL. En comparant, les deux études à 90 et 100°C, la phase obtenue à plus haute température se comporte comme une phase préparée à 90° avec un temps de mûrissement deux fois plus long. Dans le cas d'un excès d'urée, la phase obtenue contient majoritairement des ions chlorures alors que les valeurs de pH sont plus élevées. La présence de molécules d'urée dans la structure HDL empêche l'échange ionique  $Cl^-/CO_3^{2-}$ . En effet, la phase HDL  $[Zn-Al-CO_3]$  présente une structuration optimale des domaines interfeuillets et de la surface des cristallites par un réseau compact d'ions  $CO_3^{2-}$  en interactions avec des molécules d'eau. Le réseau de liaisons Hydrogène se développe sur toute la surface des feuillets. Dans le cas de la phase HDL  $[Zn-Al-Cl]$  le réseau  $Cl^-/H_2O$  est beaucoup moins compact, la distance interlamellaire est plus élevée, les molécules d'urée peuvent entrer en interaction avec les ions  $Cl^-$  et les OH des feuillets. Les molécules d'urée stabilisent le réseau  $Cl^-/H_2O$  et la phase  $[Zn_2-Al-Cl]$ .

#### *IV Synthèse de $[Zn_2-Al-Cl]$ par décomposition enzymatique de l'urée*

La précipitation des HDL étant possible par décomposition de l'urée, il nous est apparu original et source de résultats nouveaux de pouvoir utiliser la voie enzymatique pour la décomposition de l'urée. L'objectif de cette étude est donc d'élaborer des Hydroxydes Doubles Lamellaires par un procédé de type **biominéralisation** en utilisant l'uréase, protéine active pour l'hydrolyse de l'urée. Des modifications importantes de morphologie sont à attendre pour les matériaux HDL ainsi préparés. Ce travail explore pour la première fois un procédé de **biosynthèse** des phases HDL. La comparaison avec la précipitation par hydrolyse thermique de l'urée est intéressante car les conditions de chimie douce sont très différentes en terme de température dans les deux cas. Au-delà de l'intérêt purement « synthèse de matériaux à morphologie contrôlée », la démonstration qu'une biomolécule peut maintenir son activité au cours de la formation d'une phase HDL ou de l'interaction avec cette phase

HDL ouvre des perspectives très intéressantes pour l'élaboration de matériaux bio-inorganiques selon un procédé « one-pot ».

#### ***IV.1 Synthèse***

Nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à l'action de différents paramètres sur la formation de [Zn<sub>2</sub>-Al]. L'effet de la concentration en urée ou en uréase, le temps de réaction et l'activité enzymatique ont été examinés.

Le protocole utilisé est le suivant :

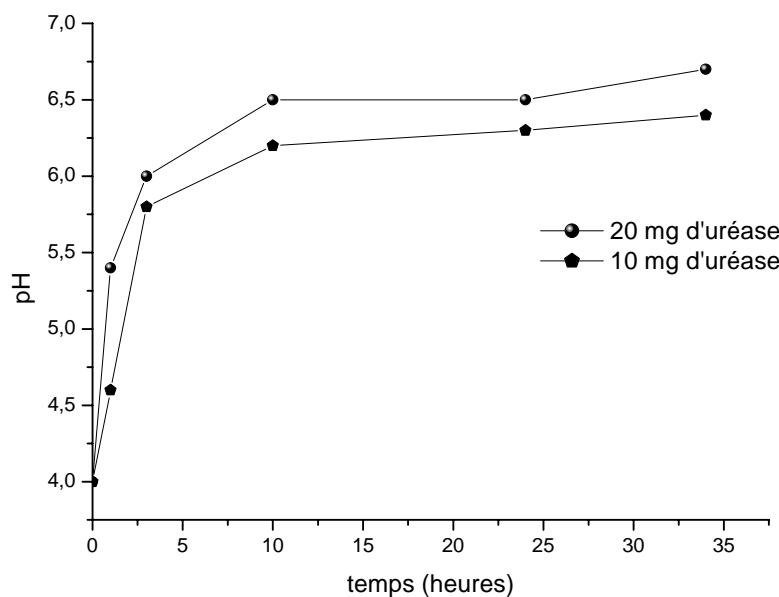
20 ml d'une solution de chlorures de zinc et d'aluminium dans un rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+} = 2$  et de concentration totale en cations métalliques 0,1 M sont ajoutés dans une solution d'urée telle que les rapports [urée]/[sels] soient égaux à 3,3, 10,0 et 20,0. Puis pour activer l'hydrolyse de l'urée, une quantité variable d'uréase (5, 10 et 20 mg) a été mise dans le milieu réactionnel. La solution est agitée entre 2 à 12 jours sous atmosphère inerte. Le précipité obtenu est alors centrifugé, lavé deux fois dans de l'eau décarbonatée puis séché à température ambiante. Les activités enzymatiques des jack bean uréases utilisées sont : 54,2 et 22,8 unité/mg.

#### ***IV.2 Etude des paramètres influençant la synthèse***

##### ***IV.2.1 Effet de la concentration d'uréase***

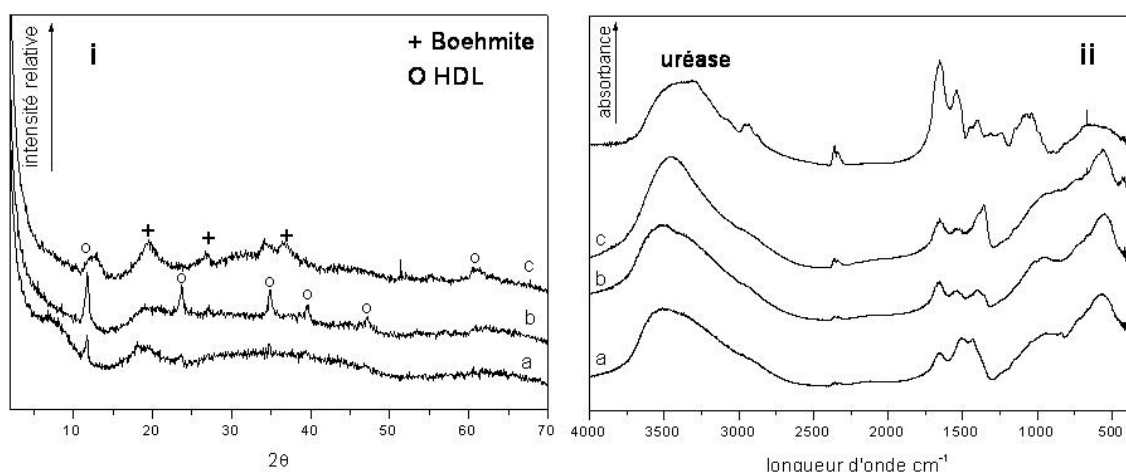
Les produits obtenus ont été réalisés avec des quantités différentes d'uréase à 54,2 unité/mg (5, 10 et 20 mg). Les conditions expérimentales sont les suivantes : [urée]/[sels]=3,3 et 2 jours de synthèse.

Lors de la décomposition de l'urée par l'uréase (Figure 19), l'évolution du pH est beaucoup plus rapide que pour l'hydrolyse thermique de l'urée. Aucune étape de précipitation n'est mise en évidence sur le profil de pH. Les courbes obtenues s'apparentent plus au cas de l'hydrolyse thermique de l'urée à 100°C ou avec un excès d'urée. Le doublement de la quantité d'uréase a un effet modéré sur la vitesse d'hydrolyse. Le pH final atteint des valeurs comprises entre 6 et 7, similaires aux valeurs obtenues pour l'hydrolyse thermique (6,80 à 192h).



**Figure 19 : Evolution du pH d'une solution aqueuse d'urée en fonction de la quantité d'uréase**

Dans le cas de la bio-précipitation des phases HDL, les diffractogrammes X montrent pour les faibles taux d'uréase (5 et 10 mg) la co-existence de deux phases mal cristallisées, boehmite et HDL (Figure 22) alors que pour 20 mg d'uréase uniquement la phase boehmite est obtenue. En effet, dans ces conditions de pH, la formation de l'hydroxyde d'aluminium est encouragée. La distance interlamellaire de la phase HDL précipitée (7,5 Å) indique la formation d'une phase carbonatée.



**Figure 20 : i) Diffractogrammes X et ii) Spectres infrarouge des phases préparées avec a) 5 mg, b) 10 mg et c) 20 mg d'uréase**

Pour confirmer la présence de la phase  $[\text{Zn-Al-CO}_3]$ , les matériaux ont été analysés par spectroscopie infrarouge. La Figure 20 ii) c) révèle les bandes de vibrations du réseau HDL attribuées aux liaisons M-O (841 à 647  $\text{cm}^{-1}$ ) et O-M-O (427  $\text{cm}^{-1}$ ). L'augmentation de la

bande à 427 cm<sup>-1</sup> suggère que la formation du feuillet HDL est favorisée par l'augmentation de la quantité d'uréase. Curieusement, le diffractogramme de cet échantillon ne révèle pas la présence d'une phase HDL. Cependant on observe vers 60° en 2θ, la présence d'une raie souvent identifiée par les phases HDL comme la réflexion (110). Par ailleurs, la bande à 1360 cm<sup>-1</sup> caractéristique de la vibration  $\nu_3$  des carbonates informe sur la nature de l'anion intercalé. Une bande intense à une fréquence située vers 950 cm<sup>-1</sup> est attribuée à la phase d'hydroxyde d'aluminium. Ces résultats corroborent la diffraction des rayons X dans laquelle, la précipitation de deux phases mal cristallisées est observée. En améliorant la précipitation de l'HDL, la phase riche en aluminium s'estompe et l'intercalation de carbonates entre les feuillets HDL est incitée. Il faut noter, toutefois, l'adsorption de l'uréase par la matrice. Les bandes<sup>30</sup> observées à 1652 et 1543 cm<sup>-1</sup> correspondant aux modes d'étirement et de déformation de C=O (amide I) et N-H (amide II), respectivement ont pu être identifiées. La présence de l'enzyme dans le matériau sera discutée à la fin de ce chapitre. La concentration d'enzyme ne semble pas être un paramètre prépondérant. Il est possible que les conditions expérimentales ne soient pas optimales.

#### IV.2.2 Effet du temps

Dans ce travail, les conditions expérimentales sont similaires à celles de l'étude précédente. Différentes phases ont été comparées à 2, 6 et 12 jours de réaction par précipitation avec 20 mg d'uréase.

Les diffractogrammes des rayons X identifient la présence d'une phase [Zn-Al-CO<sub>3</sub>] dès 6 jours de précipitation (Figure 21). En favorisant le mûrissement, la cristallinité du matériau est améliorée. Mais la précipitation d'hydroxyde d'aluminium amorphe est aussi mise en évidence au début de la synthèse et s'atténue en fonction du temps. Avec une distance inter-réticulaire  $d_{110}$  identique ( $d_{110} = 1,528 \text{ \AA}$ ), les phases obtenues au bout de 6 jours et 12 jours présentent le même rapport molaire Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup>. La phase HDL précipite entre 2 et 6 jours, au-delà la disparition de la phase amorphe boehmite indique qu'on a atteint l'étape de mûrissement du matériau.

<sup>30</sup> K. Ogura, *Analytica Chimica Acta*, 384, 1999, 219



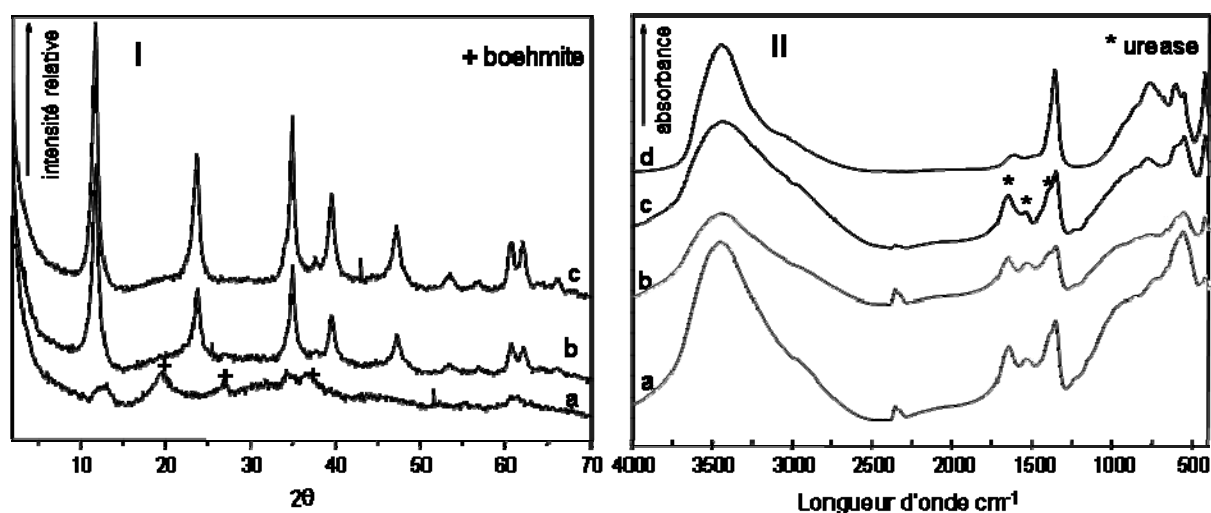


Figure 21 : i) Diffractogrammes X et ii) Spectres infrarouge des phases préparées pour un mûrissement de a) 2, b) 6 et c) 12 jours et d)  $[\text{Zn}_2\text{-Al-CO}_3]$  coprécipitée

La spectroscopie infrarouge confirme ces observations (Figure 21). L'augmentation de l'intensité de la bande de vibrations O-M-O à  $427\text{ cm}^{-1}$  et l'affinement des raies entre  $500$  et  $800\text{ cm}^{-1}$  confirment la formation d'une phase hydroxyde double lamellaire de plus en plus structurée. La bande de vibration des  $(\text{CO}_3^{2-})$  s'intensifie indiquant que la phase se carbonate progressivement avec le temps. Il est à noter que l'uréase est toujours piégée dans la matrice inorganique.

La transformation de la phase amorphe d'hydroxyde d'aluminium en phase HDL  $[\text{Zn-Al}]$  est beaucoup plus lente que dans le procédé d'hydrolyse thermique, malgré les conditions de pH favorables. La température de la solution apparaît être un facteur clé dans cette réaction.

#### IV.2.3 Effet de la concentration d'urée

L'effet de la concentration d'urée a été évalué dans les conditions suivantes :  $10\text{ mg}$  d'uréase et un temps réactionnel de 2 jours. Différentes phases ont été comparées lors de la préparation d'hydroxydes doubles lamellaires en utilisant un rapport  $[\text{urée}]/[\text{sels}] = 3,3, 10$  et  $20$ .

Quelle que soit la concentration d'urée mise en solution, les courbes de pH en fonction du temps sont pratiquement superposables (Figure 22). On montre ici l'importance de l'effet tampon du milieu qui atteint rapidement un plateau de  $[\text{H}^+]$ , quelle que soit l'évolution des concentrations des autres espèces.

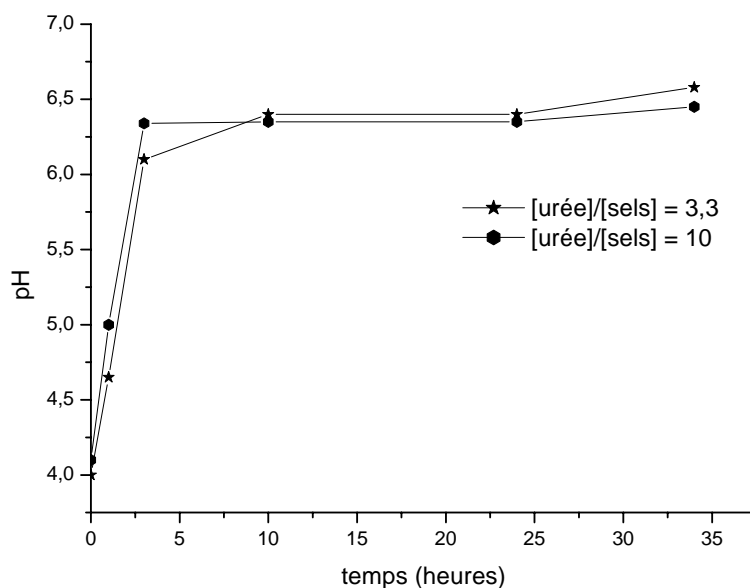


Figure 22 : Evolution du pH en fonction de la concentration d'urée

Les diffractogrammes des rayons X confirment la précipitation de l'hydroxyde double lamellaire (Figure 23.a). La cristallinité du matériau est fortement influencée par la quantité de base ajoutée. L'augmentation de la quantité d'urée en solution conduit à une libération accrue d'ions  $\text{OH}^-$ , agents de précipitation de l'HDL. Il est donc évident que l'uréase répond à ces changements de concentrations. L'enzyme reste active durant le procédé de précipitation. L'étape de croissance cristalline intervient plus rapidement aussi. La présence d'impureté amorphe de type boehmite est cependant toujours identifiée.

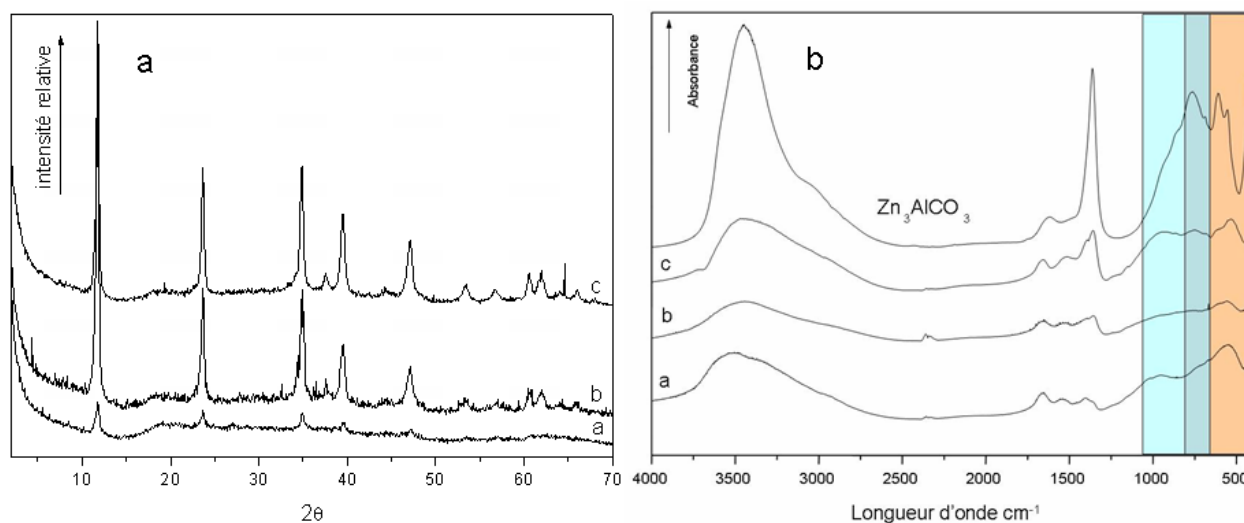


Figure 23 : a) Diffractogrammes X et b) Spectres infrarouge des phases préparées à 2 jours de réaction pour des rapports  $[\text{urée}]/[\text{sels}]$  égales à a) 3,3, b) 10 et c) 20 et spectre infrarouge d'une phase  $[\text{Zn-Al-CO}_3]$  coprécipitée

La position de la raie (110) n'est pas modifiée par ces changements de concentration d'urée, le rapport molaire Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> est fixé dès le début de la réaction, comme nous l'avons déjà montré dans l'étude précédente.

Les spectres infrarouge sont caractéristiques des hydroxydes doubles lamellaires (Figure 23. b). L'affinement des raies suggère une amélioration de la cristallinité provoquée par une organisation plus développée du matériau. La raie caractéristique des carbonates à 1360 cm<sup>-1</sup> augmente avec l'ajout de l'urée comme attendu.

Malgré un diffractogramme de rayons X qui révèle la présence plus soutenue de la phase HDL ([urée]/[sels]= 20), la bande à 950 cm<sup>-1</sup> observée sur le spectre infrarouge est très intense. En outre la bande à 427 cm<sup>-1</sup> caractéristique de la vibration M-O est absente. Il est possible que dans ces conditions d'excès d'urée, la phase majoritaire soit de l'hydroxyde d'aluminium.

Comme précédemment, la présence de l'enzyme immobilisée sur le matériau est confirmée.

#### *IV.2.4 Effet de l'activité enzymatique*

Les hydroxydes doubles lamellaires ont été préparés dans les conditions suivantes : [urée]/[sels] = 20, 10 mg d'urée et 2 jours de synthèse. Les uréases utilisées ont des activités enzymatiques différentes : 22,8 unité/mg (U<sub>22,8</sub>) et 54,2 unité/mg (U<sub>54,2</sub>).

L'activité enzymatique de l'uréase est un paramètre qui modifie fortement le profil de pH au cours de la réaction (Figure 24). Pour une activité de 54,2 unité/mg (soit une décomposition de 54,2 μmole d'urée/ min/mg d'uréase), le pH final de précipitation est atteint après 3 heures de synthèse, alors que pour une activité deux fois moins grande, l'hydrolyse de l'urée est ralentie entraînant l'obtention du pH final plus tardivement. Dans ce cas, l'étape de précipitation initiale est clairement observée. La cinétique de précipitation est fortement ralentie.

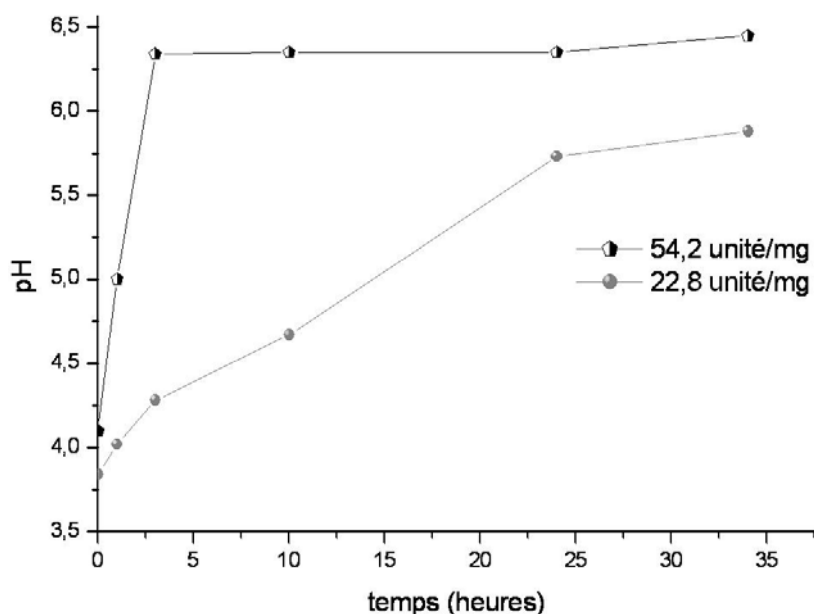


Figure 24 : Evolution du pH en fonction de l'activité enzymatique de l'uréase

En absence d'ions métalliques en solution, le pH du système Uréase/Urée atteint une valeur de 11. Pour un système contenant des ions  $\text{Zn(II)}$ , le pH de fin de réaction n'excède pas 6,5. L'effet inhibiteur du cation  $\text{Zn}^{2+}$  sur l'activité de l'uréase pourrait expliquer ces limitations de pH.

Pour confirmer la diminution de l'activité enzymatique, nous avons suivi la vitesse de relargage des ions  $\text{NH}_4^+$  grâce à une électrode spécifique. La Figure 25 montre une forte diminution de l'hydrolyse de l'urée en présence d'ions métalliques, caractérisée par une perte de 72 % de l'activité enzymatique.

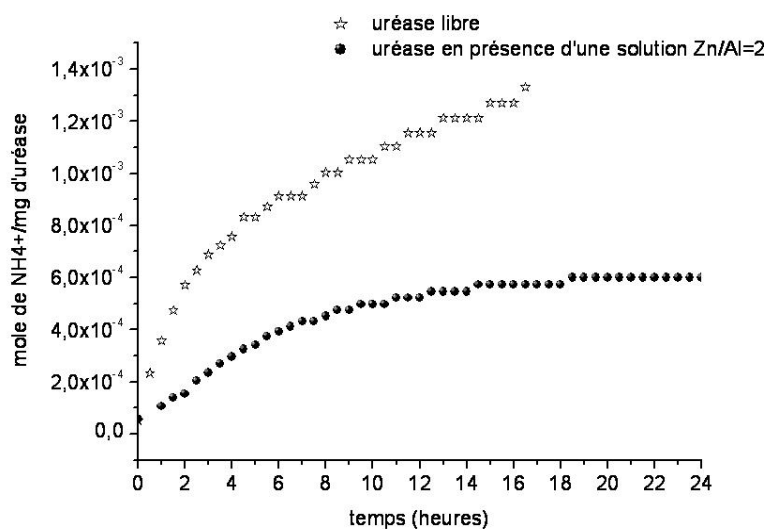


Figure 25 : Relargage de  $\text{NH}_4^+$  en présence ou non de sels métalliques

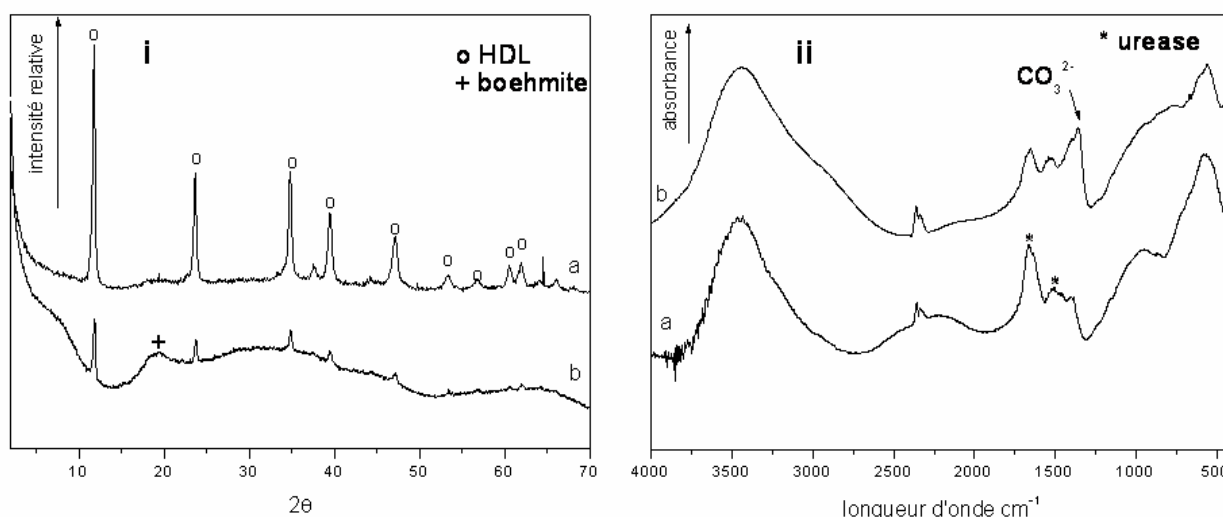
Les analyses chimiques ont été réalisées sur ces deux matériaux. Le Tableau 7 répertorie les compositions en fraction molaire. Nous pouvons constater que les rapports Zn/Al sont très loin du rapport théorique de 2. Cependant, le rapport est amélioré avec une activité enzymatique plus élevée suggérant que la phase HDL est plus importante. D'après les résultats, si on considère la formation d'une phase HDL de composition  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ , on obtient un rapport HDL/ $\text{Al}(\text{OH})_3$  égal à 3/7.

**Tableau 7 : Analyses chimiques des phases synthétisées**

Activité en unité	Zn/Al (théo)	Zn/Al	Cl/Al	$\text{CO}_3^{2-}/\text{Al}$	C/N
22,8	2	0,23	0,041	négligeable	2,2
54,2	2	0,59	négligeable	0,13	6,6

L'analyse du rapport C/N pour les deux phases, préparées respectivement par  $U_{22,8}$  et  $U_{50,4}$  montre que dans le premier cas sa valeur se rapproche plutôt de la valeur théorique correspondant à la molécule d'urée alors que pour la dernière phase il s'explique par l'immobilisation d'uréase dans la matrice. En effet pour l'uréase, le taux C/N est de 5,24.

Les diffractogrammes des rayons X montrent que la cristallinité des phases HDL préparées est affectée par l'activité enzymatique de l'uréase (Figure 26).



**Figure 26: a) Diffractogrammes des rayons X et b) Spectroscopie infrarouge des HDL obtenus avec des activités enzymatiques différentes a) 22,8 et b) 54,2 unité/mg**

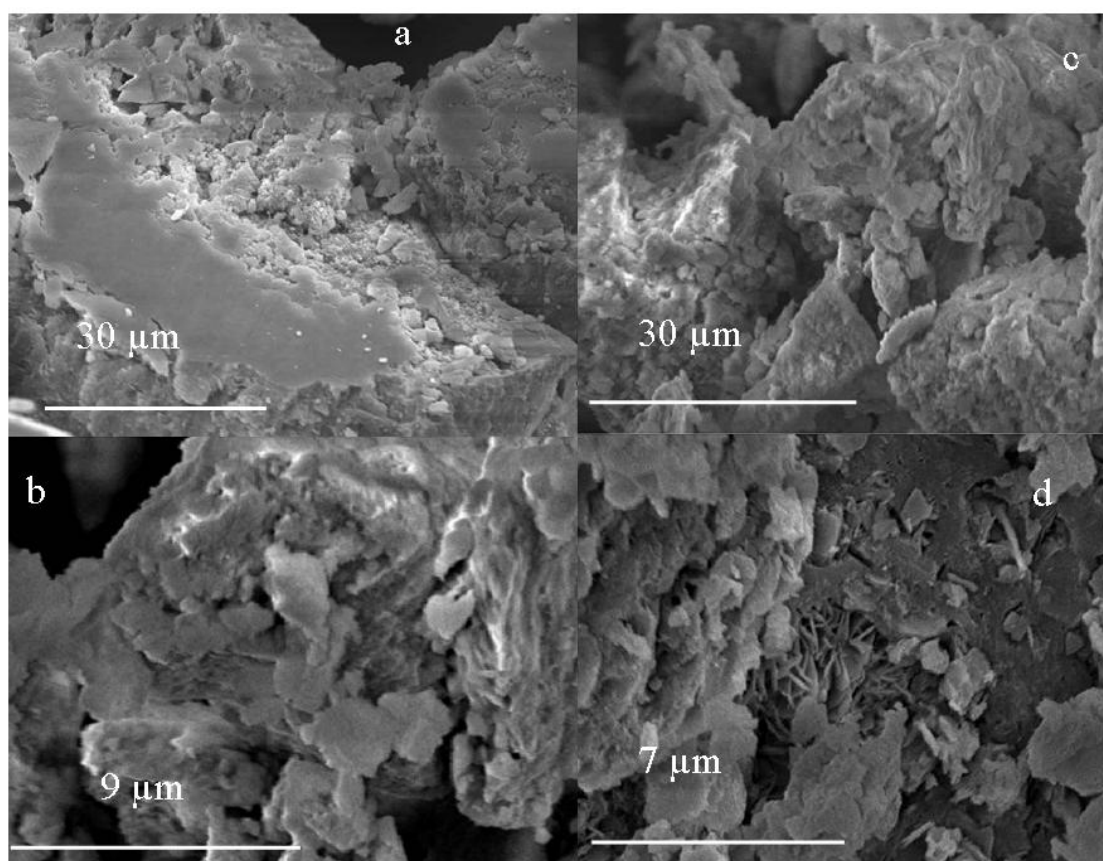
Pour une activité de 22,8 unité/mg, malgré un pH de 5,8 pour lequel la phase HDL précipite dans les conditions d'hydrolyse à 90°C, ici la phase amorphe boehmite est largement majoritaire. La présence de l'uréase en solution, seul paramètre différent, empêche la

précipitation des cations  $\text{Zn}^{2+}$  à ces concentrations en ions  $\text{OH}^-$ . Les ions  $\text{Zn}^{2+}$  peuvent être mobilisés à la surface de l'enzyme près des sites de complexation des carboxylates des résidus aspartates, glutamates ou bien des groupements amines de surface (arginine, lysine, histidine, asparagine, glutamine, sérine et thréonine). En outre, les métaux lourds ont tendance à se complexer avec la cystéine, acide aminé acteur de l'activité enzymatique.

Pour la phase préparée avec une activité d'uréase de 54,2 unité/mg, le spectre infrarouge et la diffraction des rayons X confirment la formation d'une phase  $[\text{Zn-Al-CO}_3]$  (Figure 26).

#### IV.3 Etude morphologique

Les clichés de microscopie électronique ont été réalisés sur les phases préparées en 2 et 12 jours avec un rapport  $[\text{urée}]/[\text{sels}] = 3,3$  et les phases préparées avec des activités différentes d'uréase avec un rapport  $[\text{urée}]/[\text{sels}] = 10$  (Figure 27).



**Figure 27 : Clichés MEB de la phase préparée a) en deux jours et b) en douze jours pour un rapport  $[\text{urée}]/[\text{sels}] = 3,3$  et avec une activité de c) 22,8 et d) 50,4 pour un rapport  $[\text{urée}]/[\text{sels}] = 10$**

Contrairement aux phases préparées par hydrolyse thermique, on n'observe pas précisément les particules individuelles. Après deux jours de synthèse ou pour l'utilisation d'uréase de faible activité ( $U_{22,8}$ ), il ne s'est formé que des agrégats. Cependant en 12 jours, il apparaît à certains endroits des particules. Cette observation est plus nette pour la phase préparée avec un excès d'urée et une meilleure activité d'enzyme. L'amélioration de la cristallinité et de la formation d'HDL entraîne l'identification de particules.

Une étude par microscopie électronique à transmission couplée à la diffraction électronique et à l'EDX sur cette dernière phase a révélé la présence de particules HDL cristallisées pour un rapport Zn/Al proche de 2 (Figure 28). Cependant, il apparaît aussi la présence de phases riches en aluminium avec des rapports Zn/Al compris entre 0,3 et 1 (Figure 29). Ces résultats corroborent les études structurales (diffraction des rayons X et infrarouge) effectuées préalablement sur ce matériau.

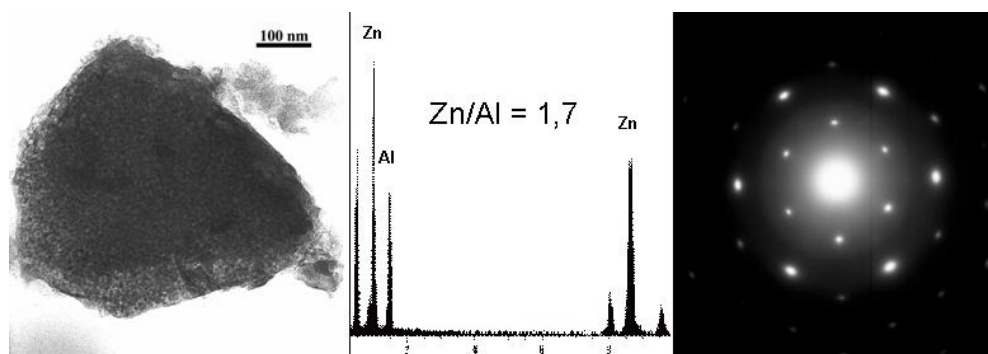


Figure 28 : Images et caractérisation sur une phase préférentiellement HDL

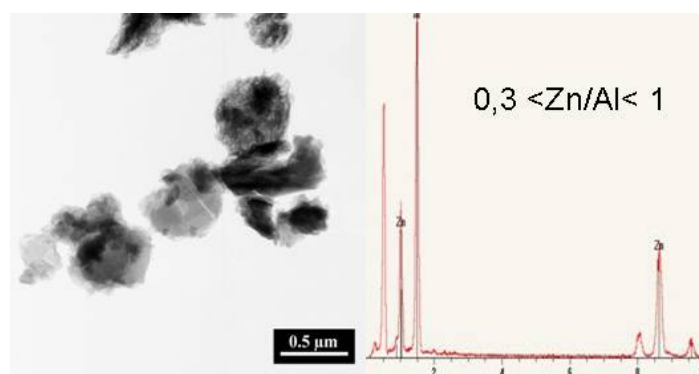


Figure 29 : Images et caractérisation sur une phase préférentiellement hydroxyde d'aluminium

La présence d'uréase entraîne une modification structurale. Dans les conditions de travail, l'uréase est chargée négativement ( $p.i.e = 5,6$ ) et peut donc par réaction d'échange anionique venir s'adsorber à la surface de l'argile. Ce phénomène peut entraîner la formation d'agrégats hybrides HDL/uréase et par conséquent empêcher la croissance du matériau. Cette diminution de l'activité enzymatique ne favorise pas la décomposition de l'urée nécessaire cette fois-ci au

mûrissement du matériau précipité. La présence de l'uréase sur la croissance des particules peut avoir un effet limitant. Ces résultats expliquent la faible cristallinité de  $[\text{Zn-Al}]$  dans ces conditions de synthèse.

#### ***IV.4 Discussion***

On observe, de manière similaire à la précipitation de la phase HDL  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  par hydrolyse thermique de l'urée, la succession des étapes de précipitation de la phase amorphe boehmite et sa transformation en HDL. Pour le procédé de biominéralisation qui se déroule à température ambiante, ces étapes interviennent dans des domaines de pH plus élevés que pour le 1<sup>er</sup> procédé. Il semble donc que l'activation thermique joue un rôle fondamental dans la réaction entre les gels amorphes d'hydroxyde d'aluminium et les cations divalents pour le 1<sup>er</sup> procédé. La co-existence des deux phases inorganiques se manifeste dans différentes conditions de préparation. Pour favoriser, la formation et la cristallisation de l'HDL, on peut agir sur plusieurs paramètres :

- utiliser de l'uréase ayant une activité élevée,
- laisser la réaction se dérouler au-delà de 6 jours en prenant soin de ne pas perdre l'activité enzymatique (on peut envisager de travailler à des températures proches de 0°C),
- augmenter les concentrations en urée.

Pour résumer, la formation d'hydroxydes doubles lamellaire est plus complexe puisqu'elle dépend de l'activité enzymatique de l'enzyme. L'inhibition générée par la présence des cations limite la précipitation de la phase HDL. En outre, l'enzyme s'adsorbe sur les particules empêchant la croissance cristalline.

### ***V Extension des synthèses à d'autres systèmes HDL $[M^{II}\text{-}M^{III}]$***

L'optimisation des conditions de coprécipitation de la phase HDL  $[\text{Zn-Al}]$  par hydrolyse de l'urée par voie enzymatique ou thermique, nous a permis d'étendre ces procédés à la préparation d'autres phases HDL, notamment  $[\text{Mg-Al}]$ ,  $[\text{Co-Al}]$  et  $[\text{Ni-Al}]$ .

Les mêmes protocoles expérimentaux décrits dans les paragraphes précédents ont été utilisés pour ces systèmes chimiques.



## V.1 Hydrolyse thermique

### V.1.1 Effet des ions métalliques en solution

Cette étude concerne la préparation de plusieurs phases telles que [Mg<sub>2</sub>-Al]<sup>8</sup>, [Co<sub>2</sub>-Al], [Ni<sub>2</sub>-Al] et [Zn<sub>3</sub>-Al] à 90°C, pour un rapport [urée]/[sels] = 3,3 pendant 24 heures.

La vitesse de décomposition de l'urée est influencée par la nature des ions métalliques divalents (Figure 30).

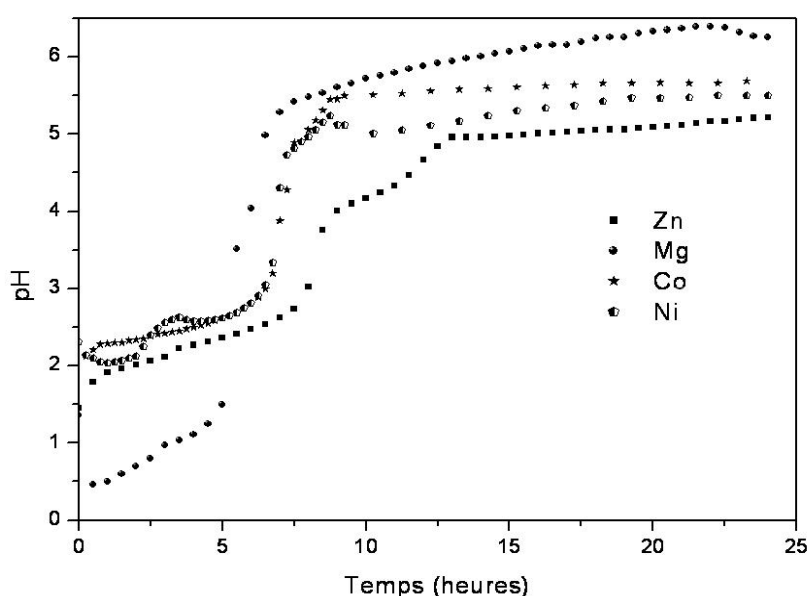


Figure 30 : Evolution du pH en fonction des cations métalliques divalents

Comparée à la formation de la phase [Zn-Al], pour les autres systèmes les cinétiques de précipitations sont plus rapides. Le Tableau 8 récapitule les différentes étapes réactionnelles pour les quatre systèmes [M<sup>II</sup>-Al] étudiés en mentionnant les temps initial et final de chaque étape et le pH final. Lors de la synthèse en présence d'ions Zn<sup>2+</sup>, on observe deux étapes de précipitation alors qu'en présence des autres ions Mg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> et Co<sup>2+</sup>, il apparaît une seule étape indiquant que ces cations métalliques consomment les ions hydroxyles à des pH supérieurs à 5.

Tableau 8 : Identification des différentes étapes de la formation des phases [M<sup>II</sup>-Al] par hydrolyse thermique de l'urée

Régions	I		II		III		IV		V		VI	
	Temps-(h)	pH	Temps-(h)	pH	Temps-(h)	pH	Temps-(h)	pH	Temps-(h)	pH	Temps-(h)	pH
[Zn-Al]	0-2	1,8	2 – 6,5	2,7	6,5-9	3,8	9-11	4,2	11-13	5	13-24	<b>5,2</b>
[Ni-Al]	0-1	2	1-2	2,11	2-3,5	2,6	3,5-5	2,6	5-9	5,2	9-24	<b>5,5</b>
[Co-Al]	0-2	0,7	2 – 6	2,6	6-9	5,4	9-24	<b>5,6</b>				
[Mg-Al]	0-1	0,4	1-5	1,4	5-7	5,3	7-24	<b>6,3</b>				

Ces matériaux ainsi que la phase [Zn<sub>3</sub>-Al] ont été analysés pour déterminer leur composition chimique. Le Tableau 9 récapitule les différentes fractions molaires.

**Tableau 9: Analyse chimique des phases préparées**

Echantillons	[Mg-Al]	[Co-Al]	[Ni-Al]	[Zn-Al]	[Zn-Al]
$M^{II}/M^{III}$ théor.	2	2	2	2	3
$M^{II}/M^{III}$ Exp.	0,17	1,82	2,84	1,60	1,95
$Cl^-/Al^{3+}$	-	0,086	0,69	0,64	0,55
$CO_3^{2-}/Al^{3+}$	0,28	0,56	0,14	0,05	0,26
$(Cl^-+2CO_3^{2-})/Al^{3+}$	0,56	1,2	0,97	0,74	1,07

Pour la phase [Mg-Al], le rapport  $M^{II}/M^{III}$  est très inférieur au rapport initial en sels métalliques. Le domaine de coprécipitation des phases HDL [Mg-Al] par la méthode standard à pH constant est de 8,5<sup>31</sup>. Dans nos conditions, le pH atteint à 90°C une valeur maximale de 6,5. Par conséquent, la précipitation de la phase HDL n'est pas favorisée. La quantité d'hydroxyde d'aluminium majoritaire diminue le rapport expérimental Mg/Al. Les autres cations divalents précipitent en hydroxyde métallique dans des domaines de pH proches de 7 ce qui explique l'augmentation du rapport R. Les systèmes [Co<sub>2</sub>-Al] et [Zn<sub>2</sub>-Al] présentent des rapports légèrement déficitaires en cations divalents, dus à des précipitations incomplètes de Co<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> ou à des compositions HDL sous-stoechiométriques en cations divalents. Dans le cas des systèmes HDL [Zn<sub>R</sub>-Al], il a été démontré au laboratoire que la coprécipitation était totale pourvu que le pH de coprécipitation augmente proportionnellement à la teneur en Zn<sup>2+</sup>. C'est pour cela que les phases à R = 2,0, 3,0 et 4,0 sont généralement préparées aux pH de 7,0, 8,5 et 9,5 respectivement. On peut noter que par hydrolyse thermique de l'urée, le pH n'excédant pas 5,2, il est difficile de préparer des phases de rapports Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> supérieurs à 2,0. C'est ce que confirme le tableau 9. Toutefois, la préparation de la phase HDL de composition idéale R=2, peut être obtenue si la quantité de zinc en solution est plus importante que la composition souhaitée. Nous n'avons pour l'instant pas d'explication pour le rapport inattendu et exceptionnellement élevé Ni<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> = 3 obtenu pour la phase à base de nickel.

<sup>31</sup> Alice Roland, Thèse, Université Montpellier II, 2002

Le degré de carbonatation des phases HDL est variable selon la matrice [M<sup>II</sup>-Al]. Les valeurs supérieures relevées pour les phases [Mg<sub>2</sub>-Al] et [Co<sub>2</sub>-Al] sont expliquées par les différences de cinétique de précipitation et des conditions de pH final plus élevées. Pour les phases formées à des pH légèrement plus acides, les ions intercalés sont majoritairement des chlorures.

D'après les analyses chimiques, l'urée a totalement réagi lors de la préparation des phases [Ni<sub>2</sub>-Al], [Co<sub>2</sub>-Al] et [Zn<sub>3</sub>-Al].

### V.1.2 Etude structurale

Les diffractogrammes des rayons X révèlent la formation de phases HDL très bien cristallisées (Figure 31).

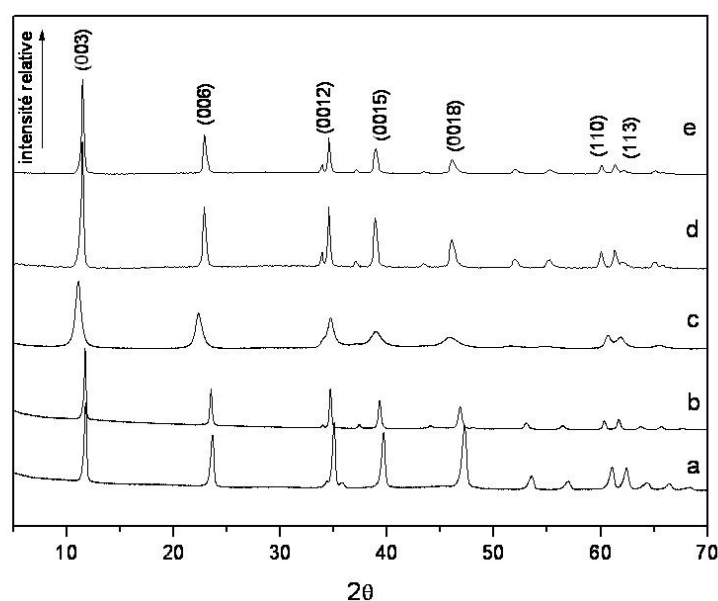


Figure 31 : Diffractogrammes des rayons X a) [Mg<sub>2</sub>-Al], b) [Co<sub>2</sub>-Al], c) [Ni<sub>2</sub>-Al], d) [Zn<sub>2</sub>-Al] et e) [Zn<sub>3</sub>-Al]

Tableau 10: Paramètres de maille affinés dans le système R-3m pour les phases [M<sup>II</sup><sub>R</sub>-Al]

HDL	[Mg <sub>2</sub> -Al]	[Co <sub>2</sub> -Al]	[Ni <sub>2</sub> -Al]	[Zn <sub>2</sub> -Al]	[Zn <sub>3</sub> -Al]
a (Å)	3.022(2)	3.061(2)	3.040(2)	3.074(7)	3,079 (6)
c (Å)	22.41 (1)	22.59 (2)	23.56 (2)	23.29 (5)	23,22 (4)
d (Å)	7.47	7.53	7.85	7.76	7,74

Les diffractogrammes des phases obtenues ne sont pas représentatifs des analyses chimiques discutées précédemment. En effet, ils sont caractéristiques de phases HDL de cristallinité élevée (Tableau 10), comparativement aux phases préparées par les méthodes standards et ne rendent pas compte de la présence de phases amorphes hydroxydes d'aluminium, même dans

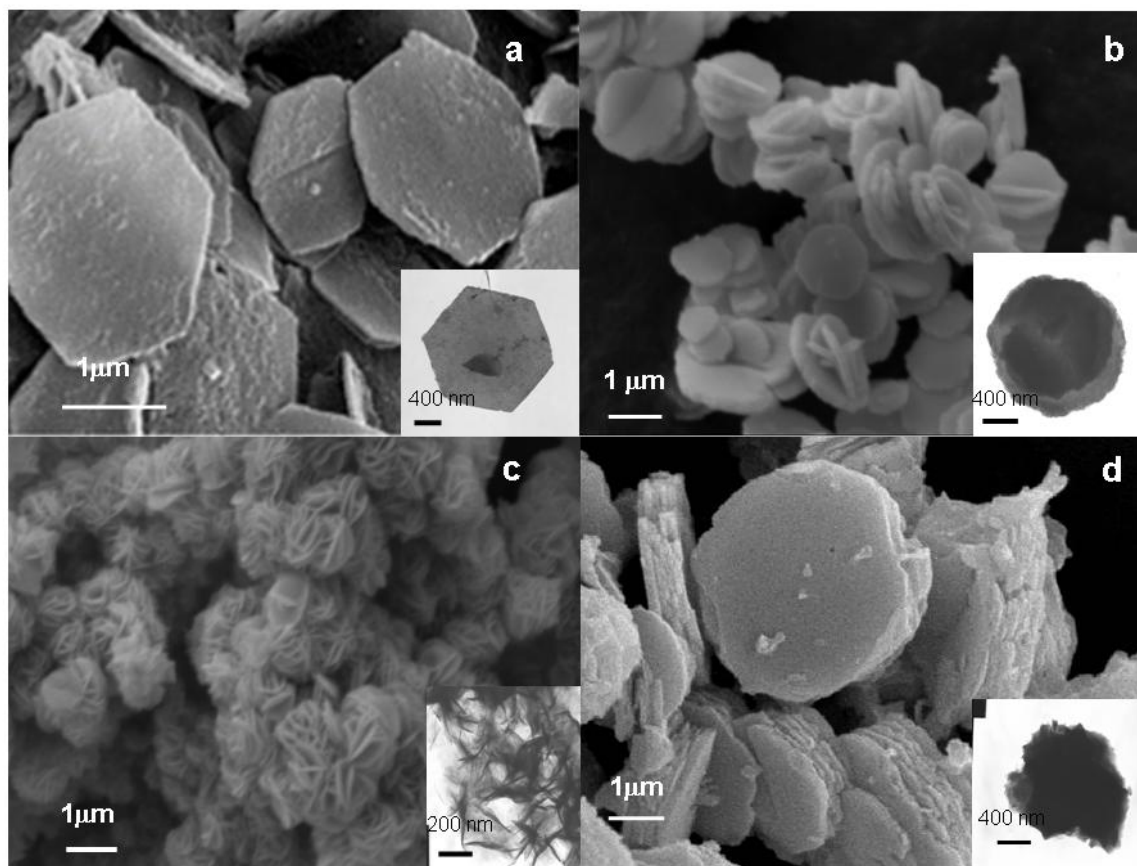
le cas du système [Mg<sub>2</sub>-Al]. On doit en déduire que cette phase amorphe Al(OH)<sub>3</sub> ou AlOOH doit être fortement dispersée entre les cristallites d'HDL. Il faut noter qu'il est difficile, même par cette méthode, d'obtenir une phase HDL [Ni<sub>2</sub>-Al] ordonnée.

Deux tendances apparaissent. Les distances interlamellaires des phases [Zn<sub>3</sub>-Al], [Zn<sub>2</sub>-Al] et [Ni<sub>2</sub>-Al] sont respectivement de 7.74, 7.76 et 7.85 Å et suggèrent l'intercalation majoritaire d'anions chlorures. Pour les phases [Mg<sub>2</sub>-Al] et [Co<sub>2</sub>-Al], les distances de 7,53 et 7,47 Å sont caractéristiques de la présence de carbonates entre les feuillets. Ces résultats confirment les analyses chimiques en terme de composition en anions Cl<sup>-</sup> et CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>.

### V.1.3 Etude morphologique

Les clichés de microscopie électronique à balayage et à transmission pour les différentes phases pour un rapport M<sup>II</sup>/M<sup>III</sup>= 2 sont regroupés dans la Figure 32.

En accord avec la littérature, les phases [Mg-Al], [Co-Al] et [Zn-Al] montrent la formation de particules individuelles et de tailles supérieures à 1µm. Cependant, la forme diffère. Les phases [Mg-Al] présentent des particules hexagonales et de taille uniforme de 2 µm. Une morphologie plus ronde apparaît pour les deux autres phases. L'HDL [Co-Al] présente des particules plus petites entre 0,75 et 1,5 µm et individuelles. La nature du cation divalent joue sur les phénomènes de nucléation et de croissance. En effet, la présence de Ni<sup>2+</sup> empêche la précipitation de grosses particules individuelles. Il se forme des particules de 200 nm agrégées en forme de « rose des sables ». Le comportement particulier des phases au Nickel est à associer à sa capacité à complexer l'urée, mise en évidence d'ailleurs dans le complexe intermédiaire Uréase-Urée. Il est donc raisonnable de penser que l'urée par ses propriétés de complexation des ions Ni<sup>2+</sup> limite leur condensation au cours de la réaction de précipitation et empêche la croissance cristalline. L'analyse par spectroscopie UV-Visible en solution pourrait nous permettre de le confirmer.



**Figure 32 : Microscopie à balayage des matrices HDL a)  $[\text{Mg-Al}]$ , b)  $[\text{Co-Al}]$ , c)  $[\text{Ni-Al}]$  et d)  $[\text{Zn-Al}]$**

En conclusion, la précipitation des phases HDL par cette méthode permet de synthétiser des particules de dimensions très homogènes.

## ***V.2 Hydrolyse enzymatique***

La précipitation d'une phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al-CO}_3]$  par décomposition enzymatique de l'urée a été mise en évidence et présentée dans le paragraphe IV. Cette méthode de synthèse a été développée pour la formation de diverses matrices telles que  $[\text{Mg}_2\text{-Al}]$ ,  $[\text{Co}_2\text{-Al}]$ ,  $[\text{Ni}_2\text{-Al}]$ ,  $[\text{Cu}_2\text{-Cr}]$ ,  $[\text{Zn}_2\text{-Cr}]$ . D'après les études réalisées précédemment, un des facteurs décisifs pour synthétiser les phases HDL les plus pures est la concentration d'urée. Le protocole que nous allons utiliser est le suivant : 10 mg d'uréase, rapport  $[\text{urée}]/[\text{sels}] = 20$  et deux jours de synthèse. L'activité enzymatique de la jack bean uréase est d'environ 22,8 unité/mg d'enzyme.

### V.2.1 Effet des cations

Dans cette étude, le pH final de fin de réaction a été mesuré et récapitulé dans le Tableau 11.

**Tableau 11 : pH final pour les différentes matrices étudiées**

Matrices	Urée	[Mg <sub>2</sub> Al]	[Co <sub>2</sub> Al]	[Ni <sub>2</sub> Al]	[Zn <sub>2</sub> Al]	[Cu <sub>2</sub> Cr]	[Zn <sub>2</sub> Cr]
pH final	11	9,8	9,7	9,7	6,5	9,8	9,6

Pour les différents systèmes étudiés, les valeurs du pH final de réaction se rapprochent de celle de l'uréase à 11, à l'exception du système [Zn<sub>2</sub>Al], dont le pH n'excède pas la faible valeur de 6,5.

La présence de métaux lourds dans des solutions d'uréase entraîne l'inhibition de l'enzyme par fixation avec la cystéine. Cependant, la désactivation dépend de la nature des cations divalents.

L'avancement de la réaction de précipitation du système [Mg-Al] a été suivi en enregistrant l'évolution du pH du milieu réactionnel au cours du temps (Figure 33.1). Parallèlement, l'activité enzymatique de l'uréase a été mesurée à partir de la variation de la concentration des ions ammoniums à l'aide d'une électrode sélective aux ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figure 33.2). De ce fait, il est possible de corréler l'évolution du pH avec la décomposition de l'urée. Pour évaluer l'effet des espèces présentes en solution (ions et phases précipitées) sur l'activité de l'uréase, les mêmes expériences ont été réalisées sur une solution aqueuse contenant uniquement le système urée/uréase.

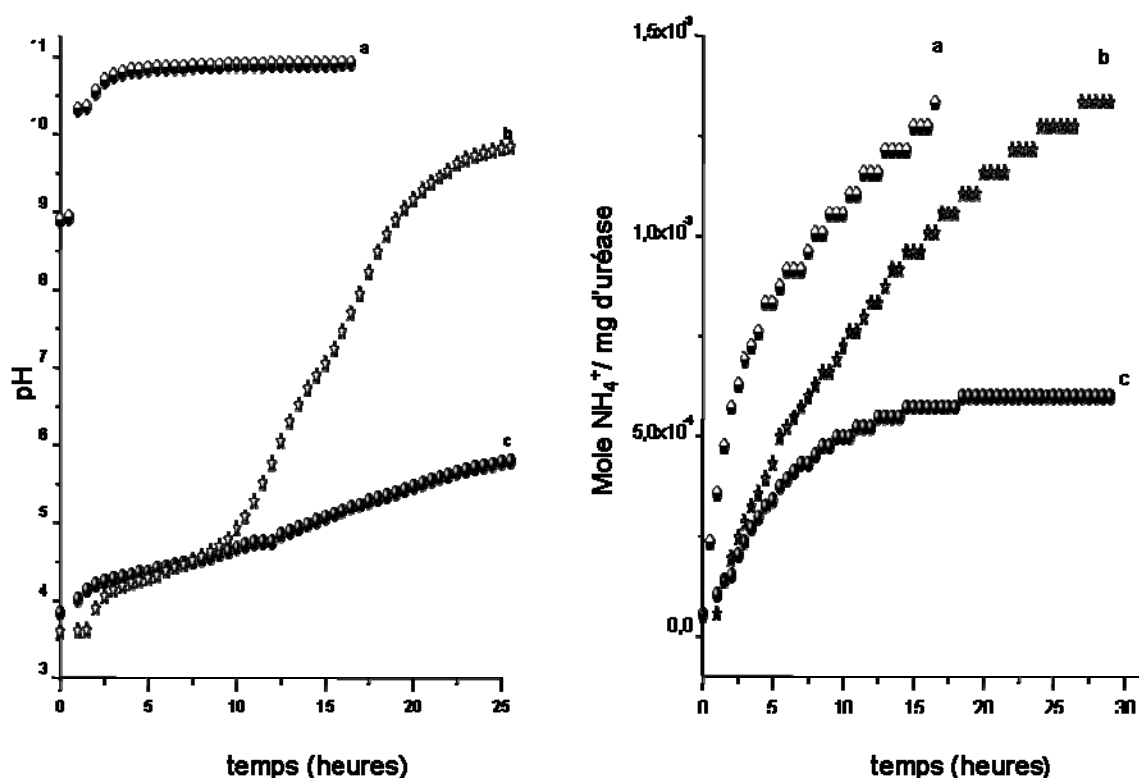


Figure 33 : Evolution 1) du pH et 2) du relargage de  $\text{NH}_4^+$  en fonction du temps lors de la décomposition d'urée dans une solution a) pure, b) contenant des sels de magnésium et d'aluminium et c) contenant des sels de zinc et d'aluminium

Dans une solution d'uréase sans ajout de sels métalliques, la décomposition de l'urée est rapide et le pH atteint son maximum ( $\text{pH}=11$ ) en trois heures. En présence d'ions métalliques, l'évolution du pH est légèrement atténuée en présence de  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Al}^{3+}$ , voire même très lente en présence d'ions  $\text{Zn}^{2+}$ . L'effet tampon des phases précipitées ( $\text{pH}=8,5$  pour une phase  $[\text{Mg}_2\text{Al}]$  et  $\text{pH}=7,5$  pour une phase  $[\text{Zn}_2\text{Al}]$ ) ne peut pas à lui seul expliquer ces différences car ce comportement se retrouve sur les courbes de relargage des ions  $\text{NH}_4^+$ . D'après ces courbes, l'activité de l'uréase est évaluée à 40 % et de 28% de l'enzyme libre durant la formation de  $[\text{Mg-Al-Cl}]$  et  $[\text{Zn-Al-Cl}]$ , respectivement. En présence de magnésium, l'hydrolyse de l'urée est juste ralentie puisque après 24 heures de synthèse, la concentration en  $\text{NH}_4^+$  s'approche de la concentration obtenue par décomposition avec l'uréase seule (15 heures). La diminution du pH peut être liée à la précipitation d'hydroxydes qui tamponne le milieu. Par contre, un plateau est atteint au bout de 15 heures en présence d'ions  $\text{Zn}^{2+}$  suggérant que l'hydrolyse est stoppée. L'inhibition de l'activité enzymatique est entraînée par la présence de cations métalliques  $\text{Zn}^{2+}$ . Mais, les concentrations en  $[\text{NH}_4^+]$  peuvent être faiblement sous estimées à cause de la possible adsorption de  $\text{NH}_3$  à la surface des particules d'argile.

Pour estimer l'influence des cations  $M^{2+}$  sur l'activité enzymatique de l'uréase, nous avons étudié l'évolution du pH dans une solution aqueuse uréase/urée en présence des cations  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ou  $Al^{3+}$ . Les valeurs du pH de fin de réaction sont comparées :  $Zn^{2+}$  (6,5) <  $Ni^{2+}$  (7,4) <  $Co^{2+}$  (8,4) <  $Al^{3+} \approx Cr^{3+} \approx Mg^{2+}$  (9,4) et mettent en évidence la diminution de l'effet inhibiteur de  $Zn^{2+}$  jusqu'à  $Mg^{2+}$ .

Les analyses chimiques ont été effectuées sur ces différentes matrices. Le Tableau 12 ci-dessous récapitule les fractions molaires. Le rapport  $M^{II}/M^{III}$  se rapproche du rapport théorique lorsque l'inhibition est diminuée, indiquant que les cations divalents ont pratiquement tous réagi. Cependant, la somme des anions comparée à la quantité d'aluminium reste très faible.

**Tableau 12 : Analyses chimiques des phases préparées (fraction molaire)**

Echantillon	[Mg-Al]	[Co-Al]	[Ni-Al]	[Zn-Al]
$M^{II}/M^{III}$ théor.	2	2	2	2
$M^{II}/M^{III}$ Exp.	1,77	1,11	1,67	0,23
$Cl^-/Al^{3+}$	0,012	-	0,0016	0,041
$CO_3^{2-}/Al^{3+}$	0,051	0,16	0,024	-
$(Cl^- + 2CO_3^{2-})/Al^{3+}$	0,11	0,32	0,048	0,041

### V.2.2 Etude structurale

Les diffractogrammes des rayons X révèlent la précipitation d'hydroxydes doubles lamellaires suivant ce mode de synthèse, quelle que soit la matrice étudiée, excepté dans le cas de [Zn-Cr] (Figure 34).



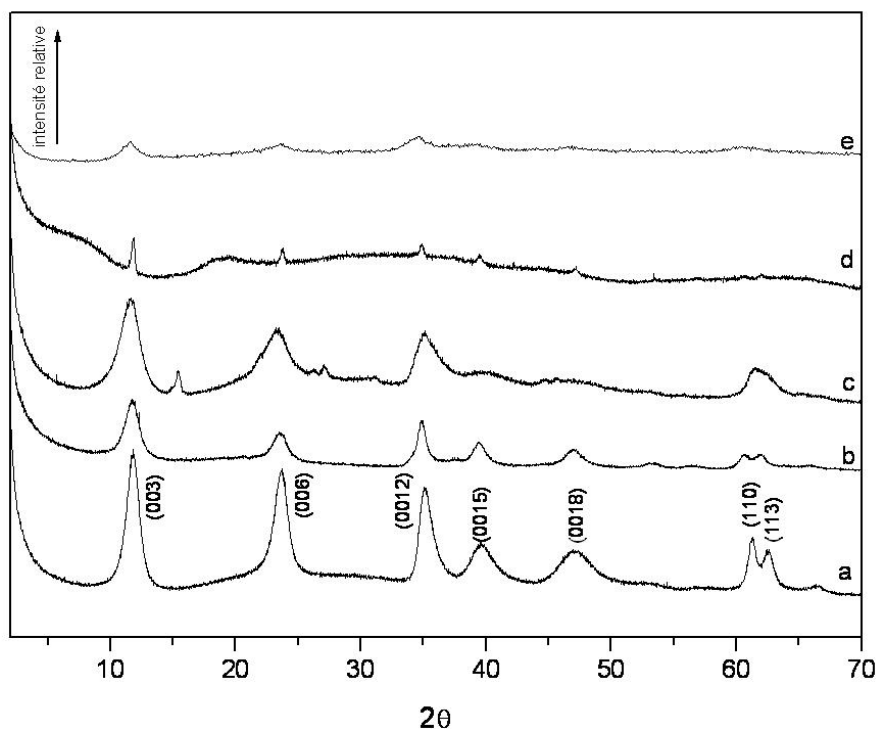


Figure 34 : Diffractogrammes X des phases a)  $[\text{Mg-Al}]$ , b)  $[\text{Co-Al}]$ , c)  $[\text{Ni-Al}]$ , d)  $[\text{Zn-Al}]$  et e)  $[\text{Cu-Cr}]$

Les paramètres de réseau, affinés suivant le modèle rhomboédrique, sont récapitulés dans le Tableau 13. La distance interlamellaire observée suggère la présence de carbonates dans la galerie. Cependant, les composés obtenus montrent une pauvre cristallinité, plus particulièrement pour la phase  $[\text{Zn-Al}]$  et  $[\text{Cu-Cr}]$ . Dans les conditions de pH inférieures à 6, la formation de phases de type hydroxyde d'aluminium est préférentiellement obtenue. Par contre, à  $\text{pH}=9,8$ , l'impureté observée sur le matériau préparé en présence de nickel correspond à l'espèce  $(\text{NH}_4)\text{Al}(\text{OH})_x(\text{CO}_3)_y$ . Cette phase apparaît lors de la précipitation d'une solution contenant seulement de l'aluminium dans les mêmes conditions de synthèse.

Tableau 13 : Paramètres de réseau affinés pour les différentes matrices

matrice	Paramètres de réseau		
	a (Å)	c (Å)	d (Å)
$[\text{Mg}_2\text{Al}]$	3.027(7)	22.73(5)	7.57
$[\text{Co}_2\text{Al}]$	3.056(3)	22.63(3)	7.54
$[\text{Ni}_2\text{Al}]$	3.021(1)	22.911(8)	7.64
$[\text{Zn}_2\text{Al}]$	3.055(2)	22.51(2)	7.50
$[\text{Cu}_2\text{Cr}]$	3.066(5)	22.67(4)	7.56

La précipitation d'HDL dépend de la nature des espèces en solution. Plus le caractère inhibiteur est prononcé, plus la cristallinité et la pureté des produits sont amoindries. Lors de la fixation des cations à la cystéine, l'activité diminue mais aussi la concentration des métaux lourds en solution. Les cations divalents ne peuvent réagir avec les OH<sup>-</sup> libérés.

#### *V.2.3 Comportement de l'enzyme*

D'après la littérature, l'immobilisation d'enzyme sur les hydroxydes doubles lamellaires est possible. Nous avons donc analysé le surnageant pour déterminer la concentration d'uréase non retenue par la matrice par dosage spectroscopique UV-visible à la longueur d'onde d'adsorption de l'uréase (275 nm).

D'après les résultats, 90 % de l'enzyme est adsorbée sur la phase [Zn-Al] alors que 56% est retenue sur [Mg-Al]. Cette forte affinité de l'enzyme pour la phase [Zn-Al] corrobore la diminution d'activité lors de la précipitation.

Des tests d'activité sur l'uréase immobilisée ont été réalisés sur le matériau fraîchement préparé. L'activité diminue fortement puisque comparée à l'enzyme libre, l'uréase immobilisée sur [Mg-Al] et [Zn-Al] révèle une perte de 92 et 90 %, respectivement.

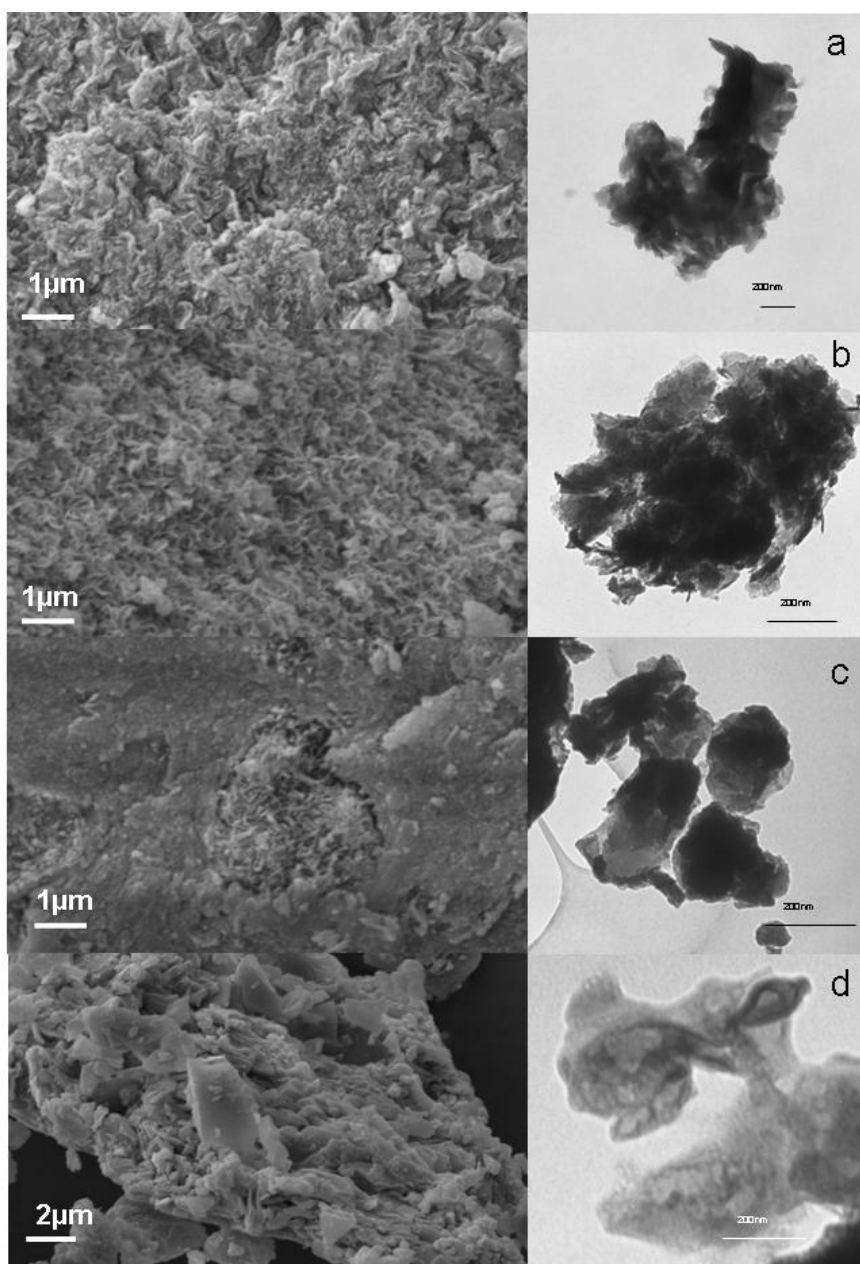
La dénaturation de l'enzyme peut être provoquée par les cations en solution, tels que M<sup>II</sup>, M<sup>III</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, l'immobilisation dans la matrice HDL et le temps de précipitation.

#### *V.2.4 Etude morphologique*

Les macromolécules comme les enzymes interviennent sur l'édification des matériaux inorganiques. L'uréase vient s'adsorber à la surface des hydroxydes doubles lamellaires et bloque la croissance des particules.

La Figure 35 montre les clichés de microscopie électronique à balayage et à transmission réalisés sur les phases préparées. Contrairement aux phases préparées par hydrolyse thermique, la voie enzymatique révèle une précipitation de petites particules de taille inférieure à 200 nm.

Dans le cas des phases les mieux cristallisées telles que  $[\text{Mg-Al}]$  et  $[\text{Co-Al}]$ , la microscopie électronique à balayage montre une texture plus homogène avec des particules ondulées et collées les unes sur les autres. Par contre, dans le cas de  $[\text{Ni-Al}]$  et  $[\text{Zn-Al}]$  cristallisé (Figure 27), deux types de régions sont identifiées : une région montrant des particules individuelles plus rigides et une région plus fondue où aucune particule ne semble se détacher. Pour une phase  $[\text{Zn-Al}]$  peu formée, seul l'aspect fondu est identifié. Ces modifications structurales dépendent évidemment de la matrice synthétisée et de son degré de cristallinité mais aussi de l'affinité de l'uréase avec celle-ci.



**Figure 35 : Micrographes des différentes matrices a)  $[\text{Mg-Al}]$ , b)  $[\text{Co-Al}]$ , c)  $[\text{Ni-Al}]$ , d)  $[\text{Zn-Al}]$**

## *VI Comportement thermique des phases HDL [M<sup>II</sup>-M<sup>III</sup>] préparées par hydrolyse de l'urée*

Le comportement thermique des hydroxydes métalliques lamellaires est fortement dépendant de la composition chimique et de leurs propriétés morphologiques. Une étude sur la décomposition thermique de ces matériaux a été réalisée par analyse thermogravimétrique et diffraction des rayons X en température afin de regarder l'effet de ces paramètres et en particulier, le taux d'échange Cl<sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> des phases [Zn-Al] préparées par la décomposition thermique de l'urée et la taille des particules.

Généralement, les matériaux d'hydroxydes doubles lamellaires [Zn-Al] présentent un schéma de décomposition sous air qui peut être simplifié en quatre étapes<sup>32</sup> :

- 1<sup>ère</sup> étape : la déshydratation qui correspond à la perte d'eau adsorbée à la surface des cristallites et intercalée. La préservation de la structure HDL est confirmée par diffraction des rayons X,
- 2<sup>ème</sup> étape : la déshydroxylation qui induit l'effondrement de la structure. La déstructuration des feuillets se traduit par une diffusion des ions Al<sup>3+</sup> hors des feuillets et une réorganisation structurale qui débute par la formation d'oxyde mixte amorphe à partir de 200°C,
- 3<sup>ème</sup> étape : le départ de l'anion entre 300 et 700 °C.
- 4<sup>ème</sup> étape : la cristallisation des oxydes amorphes ZnO et Zn<sub>2</sub>AlO<sub>4</sub> à partir de 750°C

Bien évidemment cette description ne correspond pas véritablement à la réalité, les événements thermiques étant généralement progressifs et difficiles à séparer clairement, ces étapes de décomposition se superposent et interfèrent entre elles.

La Figure 36 présente les courbes ATG et DTG de l'échantillon 3 ( 90 °C, [urée]/[sels] = 3,3, 24 heures) ainsi que les courbes DTG des échantillons 6 (192h), 7 (100 °C) et 8 ([urée]/[sels] = 10).

---

<sup>32</sup> F. Rey, V. Fornés, J. Chem Soc. Faraday. Trans., 88 (15), 1992, 2233-2238

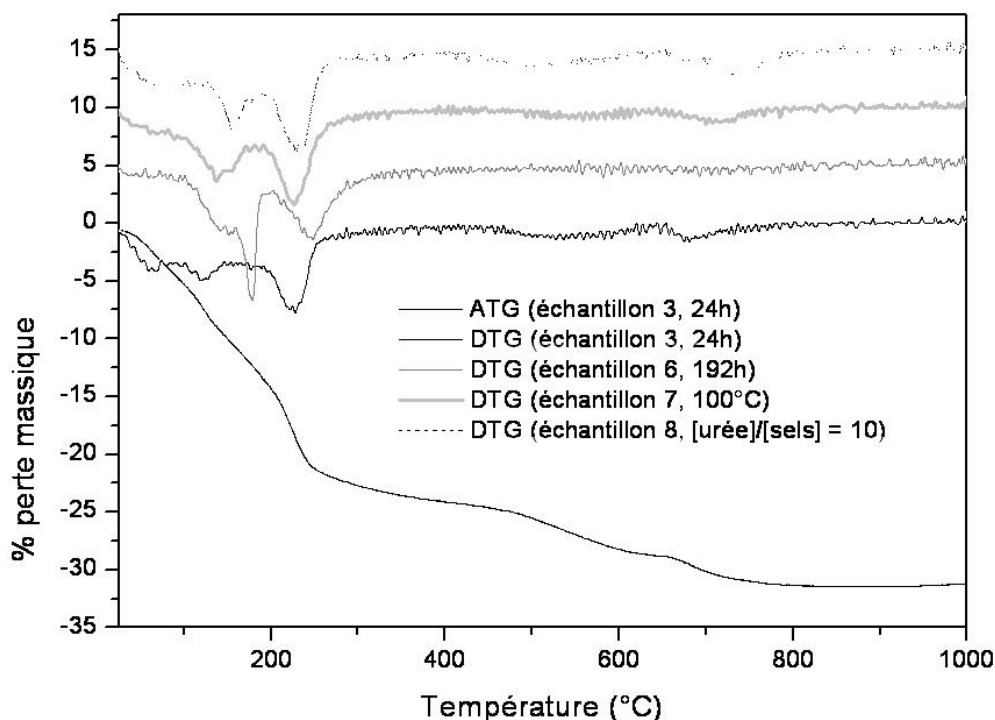
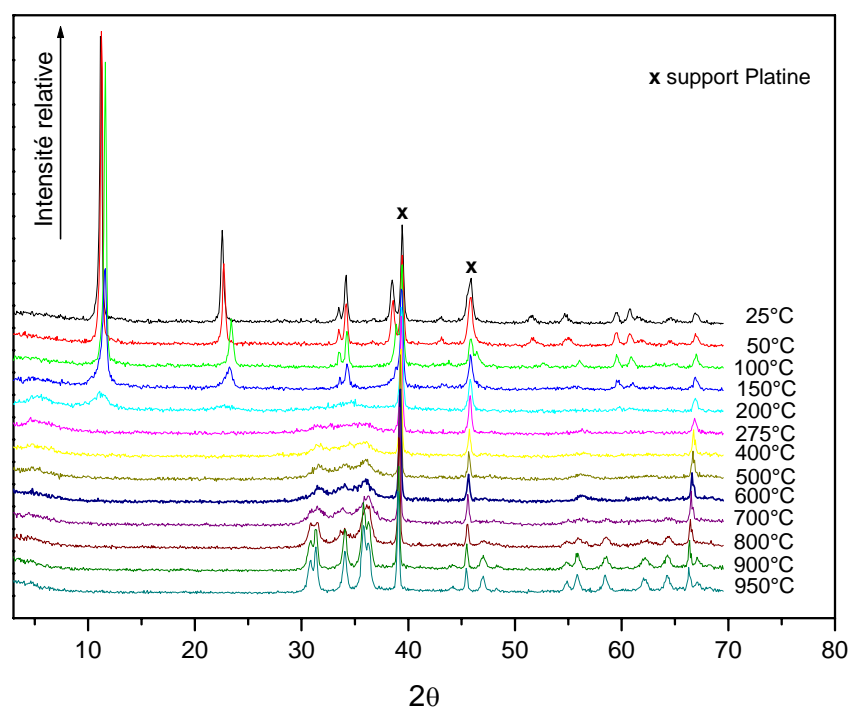


Figure 36 : Analyse thermogravimétrique de l'échantillon 3 et DTG des échantillons 3, 6, 7 et 8

Le signal DTG, dérivé du signal ATG de l'échantillon 3, identifie 5 phénomènes :

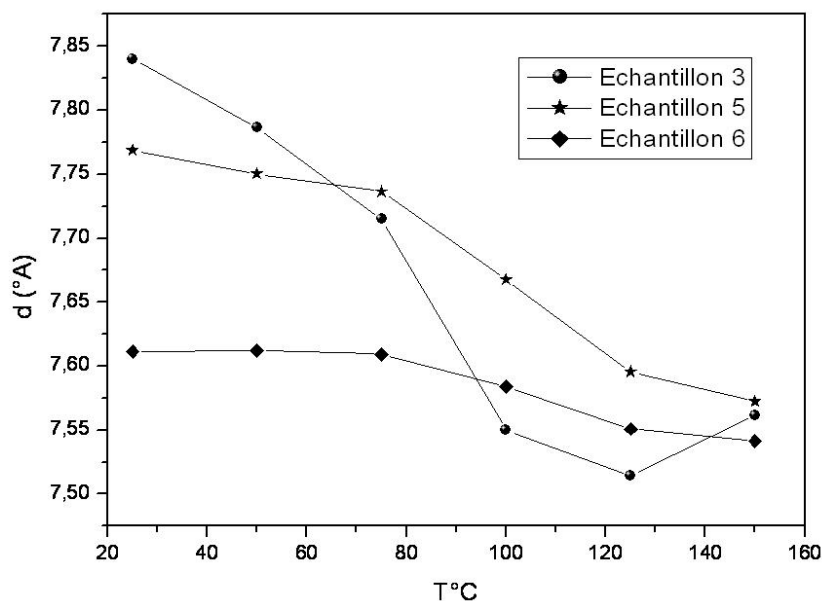
- Le premier pic vers 65°C est lié à la perte de molécules d'eau faiblement liées mais n'apparaît que pour les trois premières synthèses et correspondrait à l'eau physisorbée de l'hydroxyde d'aluminium amorphe. Le départ des molécules d'eau dans le matériau HDL cristallisé se déclare à des températures supérieures à 100°C.
- Le second pic vers 120 °C concorde avec les températures de désorption et de désintercalation de l'eau des hydroxydes doubles lamellaires coprécipités. Lors du mûrissement des phases, le pic se déplace vers des températures plus élevées, 190 °C pour l'échantillon 6 (192h).
- Le pic vers 200°C correspond à la superposition des phénomènes de déshydroxylation et de décarbonatation. Il évolue en fonction des paramètres, c'est-à-dire du taux de carbonates et de la cristallinité.
- Les deux derniers pics émergent entre 450 et 800 °C et résultent de la perte des chlorures et des carbonates restants. En fonction du temps de synthèse et de la température, la dissociation et l'intensité de ces pics s'affaiblissent.

Les diffractogrammes des rayons X en température (Figure 37) enregistrés sur l'échantillon 3 montrent la préservation de la matrice HDL jusqu'à 150 °C. A cette température les phases copécipitées dans des conditions standard subissent déjà une détérioration structurale partielle avec diminution notable des intensités diffractées. Au-delà, la structure lamellaire s'effondre et les raies de diffractions des HDL disparaissent. La déshydroxylation due à la perte des hydroxyles constituant le feuillet cationique, provoque nécessairement une destruction du feuillet qui se traduit par une amorphisation totale de la phase vers 225 °C. La cristallisation du composé amorphe en ZnO et Zn<sub>2</sub>AlO<sub>4</sub> démarre vers 400°C.



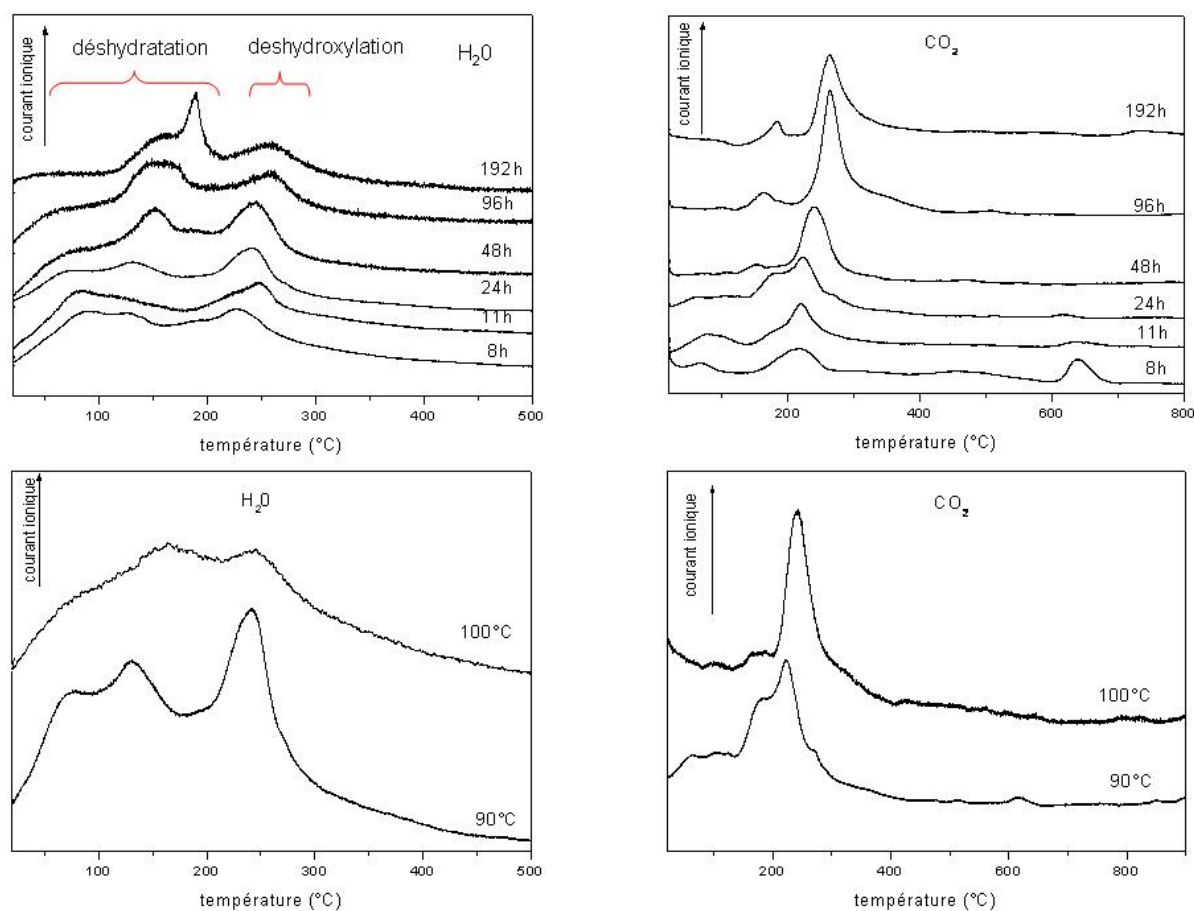
**Figure 37 : Diffractogrammes de Rayons X en température de l'échantillon 3 (24h)**

La Figure 38 montre l'évolution de la distance pour les échantillons 3, 5 et 6 (24h, 96h et 192h) entre 25 et 150 °C. L'échantillon 3 montre une forte contraction de la distance interlamellaire, lors du départ des molécules d'eau avec re-localisation des anions Cl<sup>-</sup> dans le domaine inter-feuillet. Par contre, l'échantillon 6 (192h), dont le départ des molécules d'eau a lieu à partir de 190 °C (données ATG), montre la conservation de la distance interlamellaire ( $\Delta \theta = 0.07^\circ$ ) entre 25 et 150 °C et une meilleure stabilité thermique du matériau.



**Figure 38 : Evolution de la distance interlamellaire en fonction de la température des échantillons 3, 5 et 6**

Les thermo-désorptions de  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{CO}_2$  ont été enregistrées (Figure 39) afin de relier la stabilité thermique des différentes phases à leur état de cristallinité et d'intercalation (rapport  $\text{CO}_3/\text{Cl}$ ).



**Figure 39 : Courbes de thermo-désorption de l'eau et du  $\text{CO}_2$  pour tous les échantillons en haut) de 1 à 6, en bas) 3 et 7**

Le Tableau 14 répertorie les différentes températures de décomposition en eau et dioxyde de carbone.

**Tableau 14 : Température de déshydratation, déshydroxylation, décarbonatation**

Echantillons	H <sub>2</sub> O				CO <sub>2</sub>		
	Déshydratation – T (°C)			Déshydroxylation – T (°C)	T (°C)	T (°C)	T (°C)
1 (8h)	80	127		226	67	216	638
2	80			247	77	217	638
3	68	133		242	110	224	617
4		149		243	153	238	
5		158		259	163	262	
6		158	190	255	184	261	
7		163		245		241	

Les conclusions principales de cette étude sont les suivantes :

- on note une augmentation de la température de décomposition des espèces intercalées (H<sub>2</sub>O et CO<sub>3</sub>) avec la cristallisation des phases et la transformation [Zn-Al-Cl]→[Zn-Al-CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>],
- la disparition d'eau de surface pour les phases riches en CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>,
- le retard à la déshydroxylation pour les phases [Zn-Al-CO<sub>3</sub>] plus stables.

La carbonatation des HDL entraîne une stabilisation du matériau qui se traduit thermiquement par un décalage des étapes de décomposition. La phase plus riche en carbonate, aux domaines interlamellaires plus organisés, aux interactions anions-feuillets plus fortes, se décarbonate 45 °C plus haut, après la déshydroxylation ce qui empêche encore plus l'élimination du CO<sub>2</sub>. Ce comportement confirme que pour les phases de composition mixte Cl<sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, les anions sont bien co-intercalés, il n'y a aucune ségrégation de phases au cours de la formation des phases HDL.

Le Tableau 15 résume les pourcentages de perte massique mesurés sur les thermogrammes.



**Tableau 15 : % de perte de masse des différentes étapes de décomposition des HDL**

échantillons	1	2	3	4	5	6	7	8
Conditions de prépa.	8,5 h	11 h	24 h	48 h	96 h	192 h	100°C	Urée/sel =10
% perte totale	31,67	32,73	30,56	29	27,77	25,86	28, 31	32,83
déshydratation	10,45	9,06	9,82	11	12,56	12,35	11, 03	12, 7
Déshydroxylation + Décarbonatation	15,98	15,09	13,12	11	11,61	11,21	11,9	10,88
% perte massique des anions	5,23	8,58	7,61	5,76	3,59	2,30	5,4	9,24
% perte massique des Cl <sup>-</sup> par rapport aux analyses chimiques			7,59	5,20	1,6	1,14	5,35	7,68

Pour les phases comportant majoritairement des ions Cl<sup>-</sup>, le pourcentage massique de cette espèce correspond à la somme des pertes obtenues entre 400 et 800°C. Il est difficile de quantifier la perte de CO<sub>2</sub> puisqu'elle se manifeste tout au long du traitement thermique. Par exemple, la courbe de thermo-désorption du CO<sub>2</sub> montre des pics relatifs à la décomposition dès 180°C jusqu'à 740°C. Il apparaît quand même que la majorité des carbonates se volatilisent entre 200 et 300°C. La perte vers 180 °C est probablement provoquée par la désorption du CO<sub>2</sub> sur la surface externe des cristallites. Par contre, la perte qui a lieu à de plus hautes températures correspond à la volatilisation des carbonates piégés dans la matrice calcinée amorphe.

## ***VII Conclusion***

Cette étude a montré la possibilité de synthétiser des hydroxydes doubles lamellaires par décomposition de l'urée en température ou par catalyse enzymatique et a permis de comparer les deux procédés. La précipitation de la phase est gérée par la vitesse de décomposition de l'urée. En favorisant la production d'ions OH<sup>-</sup> relargués en solution (température d'hydrolyse élevée, activité enzymatique supérieure), le rendement de formation de L'HDL et la

cristallinité du matériau s'améliorent. Les phases obtenues dans ces conditions sont constituées de particules individuelles, de taille homogène et supérieure au micron. Dans le procédé de bio-précipitation, la présence de l'uréase en grande quantité modifie la formation de l'HDL et limite leur croissance. Certains cations divalents peuvent inhiber l'activité de l'uréase et empêcher la formation des particules d'HDL.

Le mécanisme de formation des phases HDL par ces deux procédés passe par la formation initiale d'hydroxyde d'aluminium amorphe, généré par la condensation de précurseurs moléculaires de type Al<sub>13</sub>. Quand le pH de la solution est suffisant, l'attaque nucléophile des précurseurs de charge neutre des cations métalliques divalents sur les gels d'hydroxyde d'aluminium conduit à la transformation de la phase initiale en phase HDL. Le rapport M<sup>II</sup>/M<sup>III</sup> est pratiquement défini dès le début de la précipitation de l'HDL. En fin de réaction, la carbonatation des composés HDL est plus ou moins avancée en fonction des valeurs de pH atteintes. Il est à noter que le pH de précipitation à température ambiante se rapproche du pH théorique pour la formation de particules bien cristallisées et pures par coprécipitation. A 90°C, le pH est plus faible. Dès le retour à température ambiante, il se rapproche du pH théorique. Les phases obtenues sont carbonatées. Lors de l'hydrolyse de l'urée en température, le CO<sub>2</sub> produit est moins soluble. De ce fait, la concentration en carbonates est insuffisante et permet la formation d'HDL chlorée. L'augmentation du CO<sub>2</sub> entraîne par la suite la carbonatation des phases. Lors de l'hydrolyse à température ambiante, la quantité de CO<sub>2</sub> relarguée est suffisante pour précipiter des phases carbonatées. De plus, l'élévation du pH à des valeurs supérieures à 9 incite la présence du couple HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>.

La limitation de ce procédé réside dans la formation de phases HDL carbonatées. En effet, la décomposition de l'urée génère les ions CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> en solution et la forte affinité de cette entité pour les feuillettes HDL conduit inéluctablement à leur intercalation. Nous avons pu montrer dans cette étude qu'il était possible d'obtenir sous certaines conditions une phase [Zn-Al-Cl] par hydrolyse thermique de l'urée. Un échange anionique CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/Cl<sup>-</sup> à posteriori a été réalisé avec un flux gazeux d'acide chlorhydrique dans le but de réaliser des piégeages de colorants<sup>33</sup>. Cet effet négatif empêche l'obtention de phases HDL de haute cristallinité contenant d'autres anions comme les anions organiques. Pourtant, la préparation de nouvelles phases HDL hybrides organiques/inorganiques très bien cristallisées permettrait des résolutions structurales nécessaires pour la compréhension des interactions « Molécules

<sup>33</sup> U. Costantino, N. Coleti, M. Nocchetti, Langmuir, 15, 1999, 4454-4460

Invitées/Structure Hôte ». Nous avons cependant réalisé l'intercalation directement ou par échange anionique de l'hydroxycarboxylate (annexe 2).

Une autre limitation de la décomposition en température peut venir du comportement des cations avec la température. En effet, Costantino et coll<sup>4</sup> ont révélé l'impossibilité de former des hydroxydes doubles lamellaires en présence de Cr<sup>3+</sup> et Cu<sup>2+</sup>.

A température ambiante, la limitation est provoquée par l'effet inhibiteur du cation sur l'enzyme qui empêche la formation d'HDL. Cependant, nous avons montré la possibilité de précipiter une phase [Cu-Cr] dans ces conditions. La formation d'une phase [Zn-Cr] n'a pas eu lieu favorisant la précipitation d'hydroxyde de chrome.

# **Chapitre 3**

## **Adsorption et désorption de l'uréase par les phases HDL**



## Sommaire

<b>I</b>	<b><i>Introduction .....</i></b>	<b><i>127</i></b>
<b>II</b>	<b><i>Etude Bibliographique.....</i></b>	<b><i>128</i></b>
<b>II.1</b>	<b><i>Adsorption de l'uréase sur des matrices inorganiques ou organiques .....</i></b>	<b><i>128</i></b>
<b>II.2</b>	<b><i>Etude de simulation de l'adsorption de protéines sur des argiles .....</i></b>	<b><i>130</i></b>
<b>II.3</b>	<b><i>Adsorption d'enzymes sur des Hydroxydes Doubles Lamellaires .....</i></b>	<b><i>132</i></b>
<b>III</b>	<b><i>Adsorption de l'uréase sur les phases HDL [Zn<sub>R</sub>-Al].....</i></b>	<b><i>134</i></b>
<b>III.1</b>	<b><i>Protocole Expérimental.....</i></b>	<b><i>134</i></b>
<b>III.2</b>	<b><i>Etude cinétique .....</i></b>	<b><i>137</i></b>
<b>III.3</b>	<b><i>Résultats expérimentaux .....</i></b>	<b><i>138</i></b>
<b>III.3.1</b>	<b><i>Effet de la densité de charge des feuillets .....</i></b>	<b><i>138</i></b>
<b>III.3.2</b>	<b><i>Effet de la matrice hôte .....</i></b>	<b><i>143</i></b>
<b>III.3.3</b>	<b><i>Effet de la morphologie de la matrice hôte .....</i></b>	<b><i>144</i></b>
<b>III.3.4</b>	<b><i>Effet de la solution tampon.....</i></b>	<b><i>146</i></b>
<b>IV</b>	<b><i>Désorption de l'uréase .....</i></b>	<b><i>147</i></b>
<b>IV.1</b>	<b><i>Protocole Expérimental.....</i></b>	<b><i>148</i></b>
<b>IV.2</b>	<b><i>Résultats expérimentaux .....</i></b>	<b><i>148</i></b>
<b>IV.2.1</b>	<b><i>Effet de désorption avec l'eau décarbonatée .....</i></b>	<b><i>148</i></b>
<b>IV.2.2</b>	<b><i>Désorption de l'uréase avec une solution de tampon phosphate.....</i></b>	<b><i>149</i></b>
<b>V</b>	<b><i>Conclusion.....</i></b>	<b><i>150</i></b>



## *I Introduction*

L'association d'enzymes avec des composés minéraux est un phénomène souvent rencontré dans la nature. La sécrétion d'enzymes par les termites et les fourmis est un processus naturel qui a pour objectif la construction de structures solides et résistantes. Cette association Enzyme/Minéral est mise en œuvre dans des procédés nouveaux de stabilisation des chaussées par exemple, où le rôle des enzymes est de modifier les propriétés physiques et chimiques des sols par destruction de la matière organique et augmentation du taux d'humidité. Le rôle des enzymes extracellulaires dans les sols est bien connu que ce soit pour leur action dans les processus naturels de biodisponibilisation de la matière organique pour les organismes vivants ou bien encore de phytoremédiation des molécules toxiques. Les enzymes s'adsorbent principalement sur les fractions argileuses des sols qui développent des surfaces spécifiques élevées et des propriétés de charges compatibles.

L'immobilisation d'enzymes sur des solides inorganiques ou organiques est de plus en plus étudiée pour des applications en biotechnologie, l'objectif étant de protéger efficacement leur activité contre les processus de dénaturation, fréquents en milieux liquides. Une des méthodes d'immobilisation les plus employées consiste à mettre en contact l'enzyme avec le support d'immobilisation dispersé en solution aqueuse. Il s'agit ici de simples réactions d'adsorption ou physisorption qui mettent en jeu des interactions faibles de type électrostatiques, Van der Waals, ou Hydrogène. La réaction est réversible car la fixation n'est pas toujours spécifique et les risques de désorption ou relargage sont importants. Il est possible de remédier à cette limitation par la création d'une véritable liaison chimique entre l'adsorbat et l'adsorbant. On parlera alors de chimisorption.

L'adsorption dépend en général de plusieurs paramètres spécifiques à la biomolécule et à l'adsorbant comme les propriétés de surface (composition, charges électriques, dimensions) et à la solution (force ionique, pH, Température).

Comme première étape d'immobilisation de l'uréase dans les HDL, nous avons étudié les réactions d'adsorption/désorption par les matrices HDL de type  $[Zn_R-Al-Cl]$  ( $R = 2, 3$  et  $4$ ). Le pH des solutions tamponnées par les Hydroxydes Doubles Lamellaires se trouvant



supérieur au point isoélectrique de l'uréase ( $p.i.e = 5$ ) favorise les interactions entre les deux systèmes.

## ***II Etude Bibliographique***

L'étude bibliographique présentée ici se concentre sur les procédés et les mécanismes d'adsorption de l'uréase par différentes matrices inorganiques et organiques. Les activités enzymatiques mesurées après immobilisation seront discutées dans le chapitre 6.

### ***II.1 Adsorption de l'uréase sur des matrices inorganiques ou organiques***

Gianfréda et coll<sup>1</sup> ont immobilisé l'uréase sur la Montmorillonite (M) et sur la Montmorillonite modifiée par des oligomères d'hydroxyde d'aluminium(AM), composés mixtes souvent rencontrés dans les sols naturels. Pour une concentration initiale de 15 mg d'enzyme par gramme d'argile et une concentration d'équilibre inférieure à 0,05 mg/ml, la quantité d'uréase adsorbée sur l'argile augmente dans cet ordre : Montmorillonite (13,2mg/g)> Montmorillonite modifiée (11mg/g)> Hydroxyde d'aluminium (6,5 mg/g).

Les auteurs montrent que la capacité d'adsorption ne dépend pas seulement de la surface spécifique du composé minéral puisque la quantité d'uréase adsorbée est plus importante sur l'argile modifiée que sur l'hydroxyde d'aluminium à la surface spécifique plus élevée (170 m<sup>2</sup>/g pour Al(OH)<sub>3</sub> contre 100 m<sup>2</sup>/g pour la Montmorillonite modifiée). Il est à noter que la surface interne de l'argile peut-être en théorie accessible à l'adsorption même si aucune intercalation n'a pu être mise en évidence par DRX. Les propriétés d'échange cationique de la Montmorillonite semblent jouer un rôle majeur, puisque la capacité d'adsorption de l'enzyme diminue avec celle-ci au cours du traitement de l'argile par Al(OH)<sub>3</sub>. Le pH est aussi un paramètre important car la concentration en ion H<sup>+</sup> de la solution détermine les propriétés de charges de surfaces de l'enzyme et de la charpente minérale. En effet, la montmorillonite est une argile cationique, avec des feuillets chargés négativement, l'uréase est favorablement adsorbée à des pH inférieurs à son point isoélectrique (5,1). Même si la quantité d'uréase reste très importante sur la montmorillonite, elle diminue avec l'élévation du pH du fait de la neutralisation des charges de surface de l'enzyme.

---

<sup>1</sup> L. Gianfreda, M.A. Rao, A. Violante, Soil. Biological Biochemistry, 24 (1), 1992, 51-58

Le plus fort contraste d'adsorption est observé avec des hydroxydes d'aluminium ou des argiles modifiées. Dans le cas de l'hydroxyde d'aluminium, présentant une structure à charpente neutre, le pH optimal se trouve alors à un pH proche du point isoélectrique de l'enzyme, condition de la neutralité de l'enzyme, en dessous et au dessus l'adsorption diminue fortement du fait des répulsions électrostatiques entre les deux partenaires. Par contre, la quantité d'uréase ne devrait pas diminuer entre des valeurs de pH comprises entre 5 et 7. Mais la présence d'ions phosphates apportés par la solution tampon provoque une compétition entre l'enzyme chargée négativement et les phosphates qui ont tendance à venir s'adsorber sur la matrice inorganique.

Une autre étude<sup>2</sup> a été réalisée concernant l'adsorption de l'uréase sur un gel formé par réticulation de polygalacturonate de calcium. Dans les conditions étudiées (pH = 7,8 et faible force ionique), l'enzyme est complètement adsorbée sur le gel mais la quantité diminue en augmentant la force ionique par ajout de NaCl. L'adsorption est favorisée par des interactions hydrogène entre les groupements hydroxyles de la matrice organique et les groupements basiques de l'enzyme. Les interactions électrostatiques peuvent être possibles entre l'uréase chargée négativement et la matrice chargée positivement en présence de liaisons  $\text{OH-Ca}^{2+}$  à la surface du gel.

L'hydroxyapatite, matériau biocompatible, peut être un support favorable à l'immobilisation d'enzyme. L'adsorption de l'uréase a été réalisée à pH 7, 8 et 9 et à des forces ioniques différentes<sup>3</sup>. La quantité d'uréase diminue quand le pH du milieu augmente mais elle est favorisée en présence d'une force ionique plus importante. Les forces d'attraction électrostatique de surface sont dues à la présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  en bordures de cristallites. L'augmentation du pH conduit à une neutralisation des charges positives et par conséquent à une diminution de l'adsorption de l'uréase. L'augmentation de la force ionique de la solution a un effet inverse sur l'adsorption car elle réduit à la fois les interactions répulsives et attractives entre les charges de surface par augmentation de la constante diélectrique, donc révèle l'existence de fortes interactions hydrophobes.

Ces exemples ont montré que les mécanismes d'adsorption sont variés et complexes et dépendent des propriétés physico-chimiques de l'enzyme et de la matrice. Les facteurs qui

<sup>2</sup> S. Ciurli, C. Marzadori, S. Benini, S. Deiana, C. Gessa, Soil Boilological Biochemistry, 28 (6), 1996, 811-816

<sup>3</sup> C. Marzadori, S. Miletto, C. Gessa, S. Ciurly, Soil Boilological Biochemistry, 30 (12), 1998, 1485-1490

rentrent en jeu sont la capacité d'échangeurs d'ions, la surface spécifique, la charge nette de la matrice inorganique, le point isoélectrique de l'enzyme et sa compétition envers les espèces présentes en solution.

## II.2 Etude de simulation de l'adsorption de protéines sur des argiles

Une étude<sup>4</sup> de simulations de dynamique moléculaire de l'adsorption d'enzyme sur la surface de Pyrophyllite ( $\text{AlSi}_2\text{O}_5(\text{OH})$ ) a été reportée. Les interactions des divers polypeptides et de protéines (Rubredoxin, Crambin) sur la surface de l'argile primitive ou recouverte d'eau ont été étudiées. Toutes les simulations avec la Rubredoxin et la Crambin ont commencé avec un espace interlamellaire artificiel compris entre 40 et 70 Å afin de créer un espace assez large pour conserver la structure de la protéine. L'adsorption de l'enzyme à la surface de l'argile a un effet dénaturant qui implique deux phénomènes. La surface des argiles a des propriétés déshydratantes. L'organisation des molécules d'eau intercalées entre les feuillets perturbe l'environnement aléatoire des molécules de solvation autour de la protéine qui permet de maintenir la conformation de la biomolécule. La surface de l'argile peut directement établir des interactions non-liantes avec la protéine qui concurrencent les interactions entre les chaînes peptidiques. Parmi ces interactions, les liaisons hydrogène entre les hydroxyles dans l'argile et les groupements OH et NH de la protéine sont particulièrement importantes. La Figure 1 représente l'adsorption de la rubredoxin dans l'espace interlamellaire de pyrophyllite sèche.

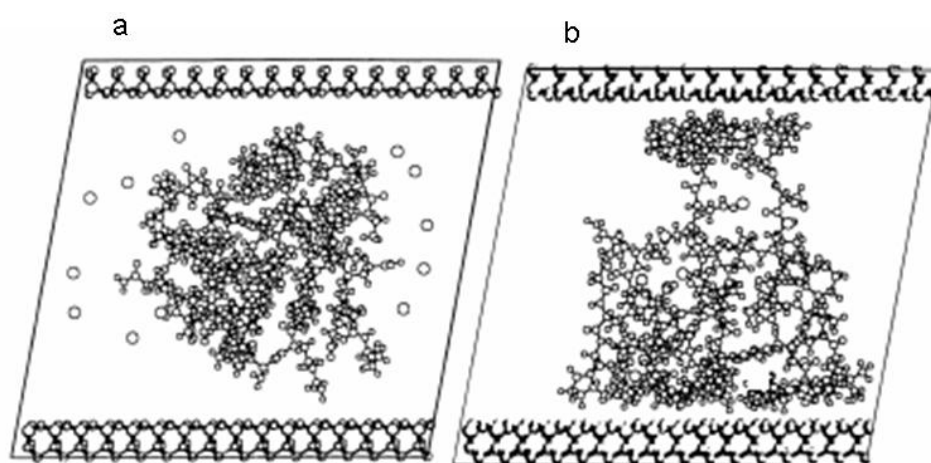
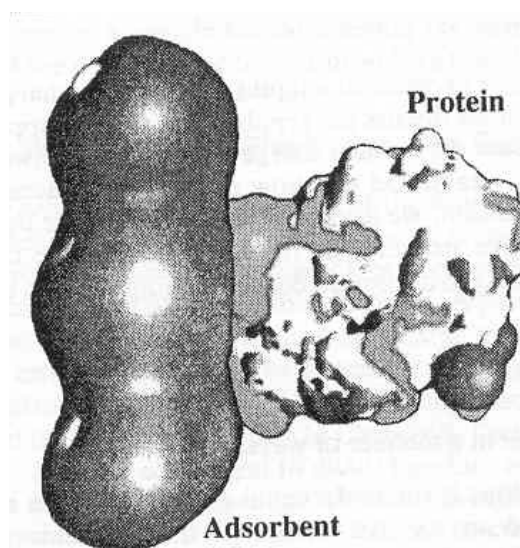


Figure 1 : Structure de la rubredoxin dans l'espace interlamellaire de la pyrophyllite déterminée par simulation a) dans son état solvatoé et b) lorsqu'elle est adsorbée sur les feuillets.<sup>4</sup>

<sup>4</sup> C.H. Yu, S.Q. Newton, D.M. Miller, B.J. Teppen, L. Schäfer, J. Molecular Structure, 556, 2000, 95-103

Pour les deux protéines choisies, le changement de conformation après adsorption est total. Il implique tous les résidus, parce que ces protéines sont de petites dimensions. Pour des systèmes plus larges, avec des masses moléculaires de 10000 à 100000 daltons, il est raisonnable de supposer que la dénaturation par adsorption est partielle, impliquant seulement des parties qui sont en contact avec la surface attractive. A cause de leur taille, certains systèmes ne peuvent pas être exploitables en utilisant la technique de dynamique moléculaire utilisée dans cette étude.

Une étude <sup>5</sup> sur la détermination des potentiels électrostatiques d'interactions Enzyme/Surface a été réalisée pour l'immobilisation du cytochrome sur une surface échangeuse anionique simulée. L'objectif de cette étude est de déterminer les zones d'interactions électrostatiques de la protéine avec le support en fonction de son orientation, de leur distance de séparation et de la force ionique. Les résultats révèlent la présence d'interactions préférentielles entre les deux composés (Figure 2). La partie en gris observée sur la protéine correspond à des zones de charge négative. Par contre, les parties en noir observées sur la protéine et sur la surface échangeuse anionique sont des zones chargées positivement. Ce schéma confirme les interactions électrostatiques entre ces deux composés.



**Figure 2 : Schéma représentatif des zones d'interactions entre la protéine et la surface échangeuse anionique<sup>5</sup>**

<sup>5</sup> D.J. Roush, D.S. Gill, R.C. Willson, Biophysical. J., 66, 1994, 1290-1300

### II.3 Adsorption d'enzymes sur des Hydroxydes Doubles Lamellaires

Alors que les Hydroxydes Doubles Lamellaires présentent des capacités d'échange ionique plus importantes que les argiles cationiques, et donc apparaissent comme des structures hôtes de choix pour les enzymes, peu de travaux ont été réalisés sur l'immobilisation d'enzymes par les Hydroxydes Doubles Lamellaires. Les expériences d'adsorption d'enzymes par les HDL présentées dans la littérature sont encore très limitées. Les auteurs des études se contentent souvent de mesures d'adsorption en un point qui ne permettent pas de calculer des capacités d'adsorption ni même de discuter des mécanismes. Notre démarche a consisté à enregistrer les isothermes d'adsorption sur une large gamme de concentrations afin de pouvoir à l'aide de modèles reconnus extraire les capacités d'adsorption et discuter la nature des interactions adsorbat/adsorbant.

Une étude<sup>6</sup> sur l'adsorption de la lipase a été réalisée sur deux matrices d'Hydroxydes Doubles Lamellaires [Mg<sub>4</sub>-Al-NO<sub>3</sub>] et [Mg<sub>4</sub>-Al-DDS] (avec DDS= dodécyl sulfate) préparées par coprécipitation. L'enzyme immobilisée a été incubée à différentes températures (30, 40, 50, 60, 70 °C) pendant une heure. La quantité d'uréase adsorbée après une heure de contact s'avère plus importante sur la phase [Mg<sub>4</sub>-Al-DDS] (70,8 %) que sur la phase nitrate (36,9 %), les mêmes observations ont été remarquées en ce qui concerne la stabilité de l'enzyme. La surface spécifique plus importante (71 m<sup>2</sup>/g) pour [Mg<sub>4</sub>-Al-DDS] comparée à celle de la phase nitrate (60 m<sup>2</sup>/g) entraîne une élévation de la concentration d'uréase à sa surface. L'effet du relargage de l'enzyme a été étudié en utilisant de l'hexane comme solvant de lavage. La lipase immobilisée dans les deux matrices a retenu son activité enzymatique à 100% même après le lavage. Ces résultats montrent que les Hydroxydes Doubles Lamellaires sont des matrices hôtes efficaces et préviennent contre le relargage de l'enzyme en solution.

La pénicilline G acylase a été immobilisée dans des matrices HDL soit par adsorption de l'enzyme sur la matrice calcinée<sup>7</sup> soit par greffage covalent<sup>8</sup>. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à la première méthode. La quantité d'enzyme adsorbée sur les phases calcinées montre une bonne rétention de l'enzyme sur la phase [Mg<sub>2</sub>-Al-NO<sub>3</sub>] calcinée

<sup>6</sup> M. B. A. Rahman, M. Basri, M. Z. Hussein, M. N. H. Idris, R. N. Z. R. A. Rahman, A. B. Salleh, Catalysis Today, 93-95, , 2004, 405-410

<sup>7</sup> L. Ren, J. He, D.G. Evans, X. Duan, R. Ma, J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 16, 2001, 65-71

<sup>8</sup> L. Ren, J. He, S. Zhang, D.G. Evans, X. Duan, J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 18, 2002, 3-11

(Tableau 1). Cependant en augmentant le rapport Mg/Al, la quantité diminue en corrélation avec la diminution de la surface spécifique et de la densité de charge des feuillets.

**Tableau 1: Effet du rapport Mg/Al sur l'activité de l'enzyme immobilisée**

Mg/Al molar ratio	Free enzyme loaded (IU/g)	Enzyme adsorbed <sup>a</sup>	
		(IU/g)	Adsorbed (%)
1.6	1647.5	1629.3	98.9
2.0	1627.4	1617.2	99.4
3.0	1629.5	1576.2	96.7
4.0	1628.4	1435.7	88.2

Il est à noter que la présence d'enzyme empêche la reconstruction de la matrice HDL calcinée. De plus, il a été observé que la quantité d'enzyme adsorbée dépend de la température de calcination des précurseurs HDL, elle augmente pour des températures allant de 230 à 450 °C, puis reste constante pour des températures supérieures, parallèlement à l'augmentation de la surface spécifique jusqu'à 400 °C et à sa stabilisation entre 400 et 600 °C. L'effet de la composition des feuillets a été mis en évidence, la phase [Mg<sub>2</sub>-Al-NO<sub>3</sub>] calcinée (T=500°C) montre une capacité d'adsorption plus importante pour l'enzyme que la phase [Zn<sub>2</sub>-Al-NO<sub>3</sub>] calcinée (T=500°C). Les auteurs l'expliquent uniquement par une augmentation de la surface spécifique sans invoquer les différences en terme de reconstruction des matrices hydroxylées.

L'adsorption de protéines dans les HDL ([Mg-Al-NO<sub>3</sub>]) a été étudiée pour la première fois au laboratoire dans le cas de la chymotrypsine<sup>9</sup>. Après un temps d'équilibre d'adsorption de 2 heures, 45 % de l'enzyme (soit 19,8 mg/g) est adsorbé pour des pH compris entre 7,5 et 8. La diminution de la quantité de chymotrypsine immobilisée diminue pour des pH élevés à cause de la compétition des carbonates. Aux pH inférieurs au p.i.e de l'enzyme, la diminution de l'adsorption est due aux incompatibilités de charges entre les feuillets et la protéine, tous deux chargés positivement.

<sup>9</sup> J. Inacio, Thèse de l'université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, 2002

L'immobilisation de l'uréase<sup>10</sup> et de la polyphénol oxydase<sup>11,12</sup> a été réalisée dans des phases HDL [Zn-Al] et [Zn-Cr], et laponite ( $\text{Na}_{0,7}\text{Si}_8[\text{Mg}_{5,5}\text{Li}_{0,5}\text{H}_4\text{O}_{24}]$ ) pour comparaison, pour la réalisation de biocapteurs. Les rapports massiques HDL/Enzyme utilisés sont de 1/1 et 1/2. Le taux d'adsorption de la PPO est élevé, il vaut 91 et 86 % respectivement pour les 2 rapports. Des électrodes sont réalisées à partir de dépôts de ces matériaux hybrides sur support carbone et pour assurer la fixation de l'enzyme, l'électrode est traitée par de la vapeur de glutaraldéhyde. Les matériaux hybrides HDL montrent une meilleure perméabilité à la diffusion du substrat. Les performances des biocapteurs sont variables, meilleures pour le système PPO/HDL mais moins bonnes pour le système Uréase/HDL par comparaison aux matériaux bio-hybrides à base de laponite. Les caractérisations structurales montrent que dans tous les cas l'adsorption a lieu sur la surface externe des matrices inorganiques.

Des anions électroattracteurs organiques<sup>13</sup> tels que 2-2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) peuvent être intercalés dans le domaine interfeuillet de l'HDL en conservant leur activité redox. La horseradish peroxydase (HRP) a été immobilisée par adsorption sur une phase [Zn-Cr-ABTS]. L'action du médiateur redox permet d'améliorer le transfert d'électrons de l'enzyme vers l'électrode du transducteur.

### *III Adsorption de l'uréase sur les phases HDL [Zn<sub>R</sub>-Al]*

#### *III.1 Protocole Expérimental*

La méthode d'adsorption utilisée consiste à additionner une masse **m** d'HDL à un volume **V** de solution d'enzyme de concentration connue **C<sub>i</sub>**, dans un récipient fermé, sous agitation, à température constante proche de la température ambiante. Après un certain temps d'équilibre, la solution est séparée du solide par centrifugation puis sa concentration en enzyme **C<sub>e</sub>** (concentration à l'équilibre dans la solution) est analysée. La différence entre la concentration initiale et la concentration à l'équilibre, nous permet de déterminer la concentration d'uréase adsorbée par masse d'argile **C<sub>s</sub>** donnée par la relation:

<sup>10</sup> J. V. de Melo, S. Cosnier, C. Mousty, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, *Analytical Chemistry*, 74, 2002, 4037-4043,

<sup>11</sup> D. Shan, S. Cosnier, C. Mousty, *Analytical Chemistry*, 75, 2003, 3872-3879

<sup>12</sup> D. Shan, C. Mousty, S. Cosnier, *Analytical Chemistry*, 76, 2004, 178-183,

<sup>13</sup> D. Shan, S. Cosnier, C. Mousty, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2004, 390-396

$$C_s = ((C_i - C_e) \times V)/m$$

L'étude de l'adsorption d'uréase sur différentes matrices a été effectuée, principalement sur la phase [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl]. Différents paramètres pouvant influencer l'affinité de l'enzyme avec la matrice ont été évalués comme :

- l'effet de charge (R = 2, 3, 4)
- l'effet de l'anion intercalé
- l'effet de taille des particules
- l'effet de la solution tampon

Les isothermes d'adsorption ont été obtenus en traçant la quantité de produit adsorbé (C<sub>s</sub>) en fonction de la concentration d'adsorbat à l'équilibre C<sub>e</sub>.

Il existe une classification des isothermes d'adsorption établie par Giles<sup>14</sup> qui traduit la nature et l'intensité des interactions adsorbat/adsorbant (Figure 3). On distingue quatre grands types d'isothermes : S, L, H et C. Les adsorptions de molécules ou macromolécules organiques sur les argiles présentent généralement soit un profil de Langmuir soit un profil de Freundlich. Un comportement de type Langmuir met en jeu des sites d'adsorption indépendants alors que celui de Freundlich tient compte d'un certain degré de compétition entre les interactions adsorbat/adsorbant et adsorbat/adsorbat.

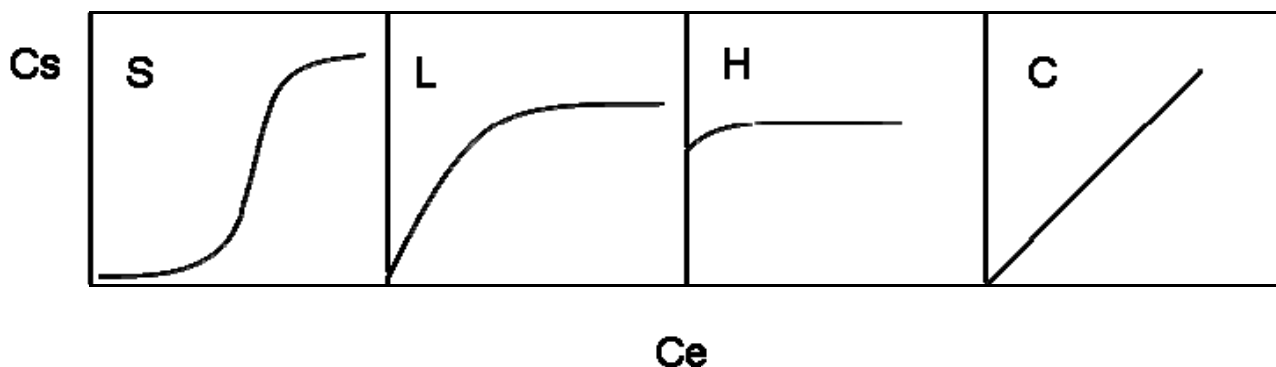


Figure 3 : Classification des isothermes d'adsorption de Giles

Les courbes d'adsorption obtenues sont modélisées suivant les équations de Langmuir ou de Freundlich.

L'équation de Langmuir peut s'écrire sous la forme :

$$C_e/C_s = C_e/C_m + 1/(C_m \cdot L)$$

<sup>14</sup> C. H. Giles, T. H. Mac Ewan, S. N. Nakhwa, D. Smith, J. Chem. Soc. London, 1960, 3973



Cm représente la quantité d'adsorbat nécessaire pour la formation d'une monocouche à la surface de l'adsorbant et L est l'affinité adsorbat/adsorbant.

La modélisation de Freundlich est définie par l'équation  $C_s = K_f C_e^{1/n_f}$  où  $K_f$  et  $n_f$  sont des constantes qui estiment la capacité et l'intensité d'adsorption, respectivement. Freundlich suppose que l'énergie de liaison (affinité) décroît exponentiellement avec l'augmentation de la saturation de la surface. L'ajustement des paramètres  $K_f$  et  $n_f$  est rendu plus facile en écrivant l'équation sous sa forme linéaire :

$$\text{Log}(C_s) = \text{log}(K_f) + 1/n_f \times \text{log}(C_e)$$

*Protocole expérimental* : 20 mg d'Hydroxyde Double Lamellaire sont mis en suspension dans 10 ml d'une solution d'uréase dont la concentration varie entre 0,1 et 2 mg/ml. Le mélange est alors agité pendant 24 heures dans un réacteur fermé à 23°C puis centrifugé à 10000 tours pendant 20 minutes pour séparer la phase hybride uréase/HDL et le surnageant contenant l'enzyme non adsorbée par l'argile. Le surnageant est ensuite analysé par spectroscopie UV-Visible à 275 nm, longueur d'onde d'absorption maximale de l'uréase (Figure 4).

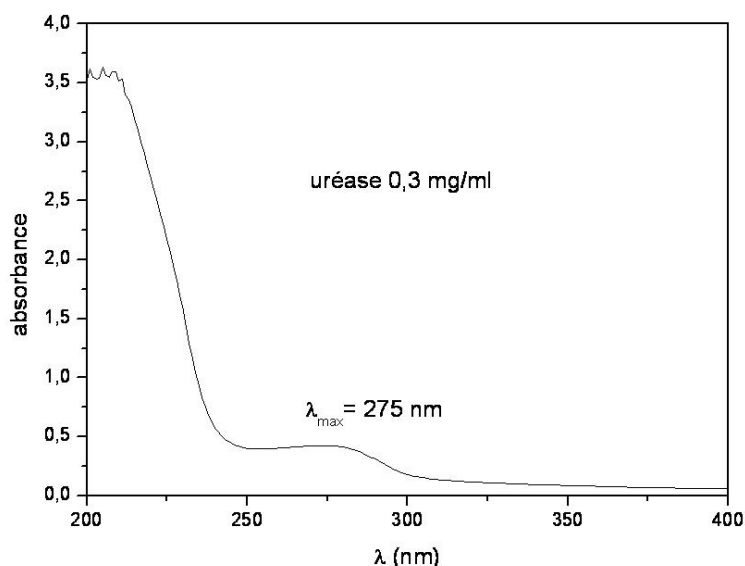


Figure 4 : Spectre UV de l'uréase à 0,3 mg/ml

### III.2 Etude cinétique

Pour déterminer le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre, une étude cinétique (Figure 5) a été préalablement effectuée sur l'adsorption d'une solution d'uréase à 1mg/ml en contact avec la phase  $[Zn_2-Al-Cl]$  ou la phase  $[Zn_3-Al-Cl]$  à 23 °C pendant des durées variables de 30 minutes à 24 heures. Les cinétiques d'adsorption peuvent être différentes puisqu'elles dépendent du couple adsorbat/adsorbant et des conditions expérimentales.

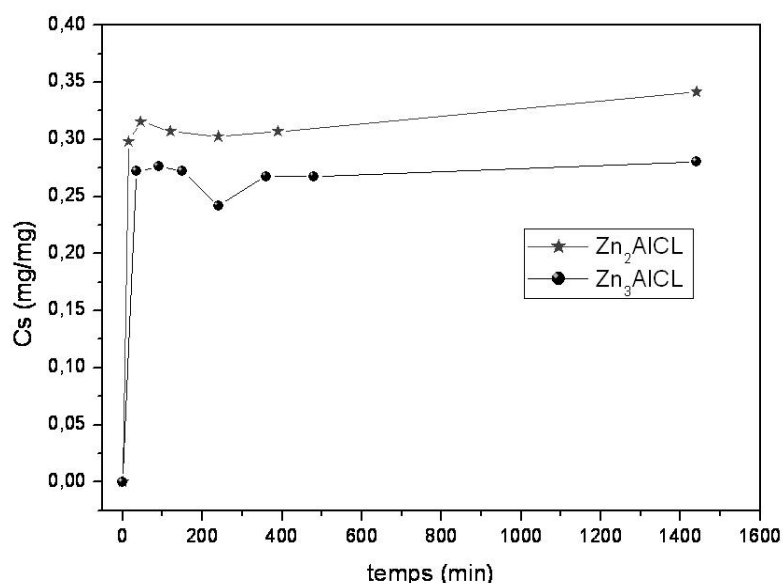


Figure 5 : Etude cinétique de l'adsorption de l'uréase

L'équilibre d'adsorption de l'uréase sur les phases HDL est atteint au bout d'une heure de contact. Cependant, après quatre heures, une légère quantité d'uréase est relarguée puis réadsorbée par la matrice hôte. Au bout de 24 heures de réaction, la rétention de la biomolécule a faiblement augmenté. Le processus d'adsorption du soluté sur les sites de surface les plus accessibles est rapide. La diffusion moléculaire dans les pores de plus petits diamètres est fortement ralentie. L'allure des courbes indique que la rétention des molécules d'uréase se manifeste à la surface des particules minérales. Les fluctuations après 1 heure peuvent aussi s'expliquer par la dispersion des particules HDL en solution dont la cinétique est plus lente.

Pour s'assurer que l'état d'équilibre soit complètement atteint, les études suivantes ont été réalisées avec des temps de contact de 24 heures.

### III.3 Résultats expérimentaux

#### III.3.1 Effet de la densité de charge des feuillets

Les isothermes d'adsorption de l'uréase sur les phases  $[Zn_R-Al-Cl]$  avec  $R=2, 3$  et  $4$  sont montrés dans la Figure 6. Les analyses chimiques de ces phases sont représentées dans le Tableau 2 et révèlent que les rapports  $M^{II}/M^{III}$  sont proches des rapports initiaux des sels métalliques.

Tableau 2 : Analyses chimiques des phases

Phases	théo $Zn^{2+}/Al^{3+}$	exp $Zn^{2+}/Al^{3+}$	$Cl^-/Al^{3+}$	$CO_3^{2-}/Al^{3+}$	$(Cl^-+2CO_3^{2-})/Al^{3+}$
$[Zn_2-Al-Cl]$	2	1,88	0,94	0,1	1,14
$[Zn_3-Al-Cl]$	3	2,97	1,06	0,11	1,28
$[Zn_4-Al-Cl]$	4	3,91	1,27	0,13	1,53

Le pH de chaque solution d'équilibre a été mesuré. Il varie entre 6 et 7 en fonction de la quantité d'enzyme initiale. Les solutions sont tamponnées naturellement par la présence de l'HDL et de l'uréase. Dans ces conditions opératoires, l'uréase est chargée négativement ( $pH > p.i.e. = 5,1$ ) et peut venir interagir avec les feuillets positifs de l'argile par interactions électrostatiques.

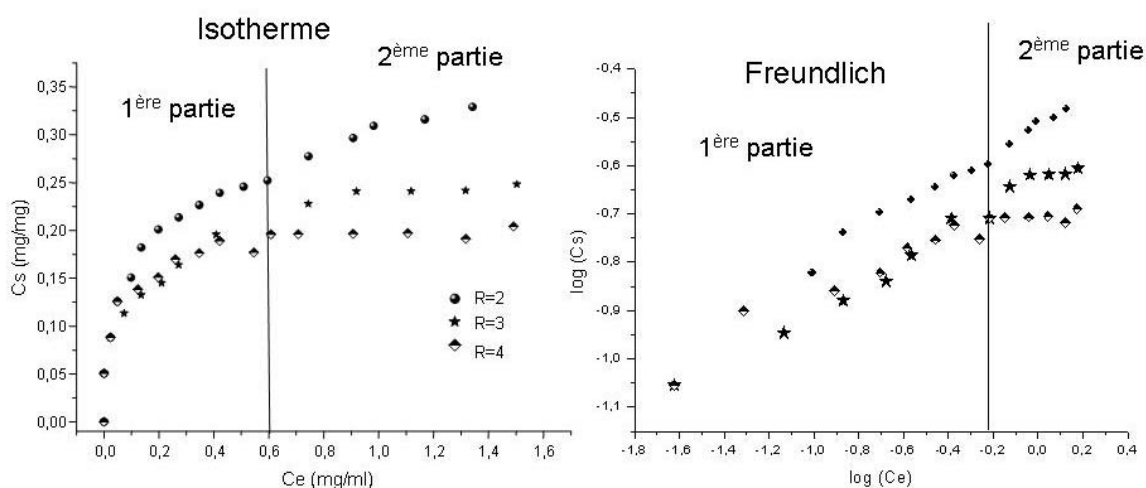


Figure 6 : Isothermes d'adsorption de l'uréase sur des matrices  $[Zn_R-Al-Cl]$  et modélisation suivant l'équation de Freundlich

Pour des faibles concentrations d'uréase ( $C_e < 0,6$  mg/ml), la rétention des biomolécules progresse linéairement (Figure 6). Les isothermes obtenus sont de type L ( $n_f > 1$ ) traduisant une

haute affinité de l'uréase vis-à-vis de la matrice  $[Zn_R-Al-Cl]$ . A ce stade, les sites d'adsorption de surface de la matrice HDL sont saturés.

Au-delà, une deuxième étape d'adsorption est mise en évidence. Pour les composés  $[Zn_3-Al]$  et  $[Zn_4-Al]$ , le plateau d'adsorption maximum est rapidement atteint alors que pour la phase  $[Zn_2-Al]$ , l'adsorption augmente jusqu'au dernier point expérimental. La deuxième étape d'adsorption, après saturation des sites de surface peut correspondre soit à un effet d'agrégation de surface des protéines soit à une modification de la surface spécifique des solides sous l'effet de la concentration croissante des enzymes. Cette deuxième partie a été modélisée suivant l'équation de Freundlich. La capacité d'adsorption a légèrement diminué par rapport à celle déterminée (325 mg/g) pour  $C_e < 0,6$  mg/ml, mais reste suffisamment importante de l'ordre de 303 mg/g. L'affinité  $n_f$  est similaire suggérant que l'adsorption de l'enzyme a lieu sur le solide.

Les isothermes ont été modélisés à partir de l'équation de Freundlich et de Langmuir (Figure 7).

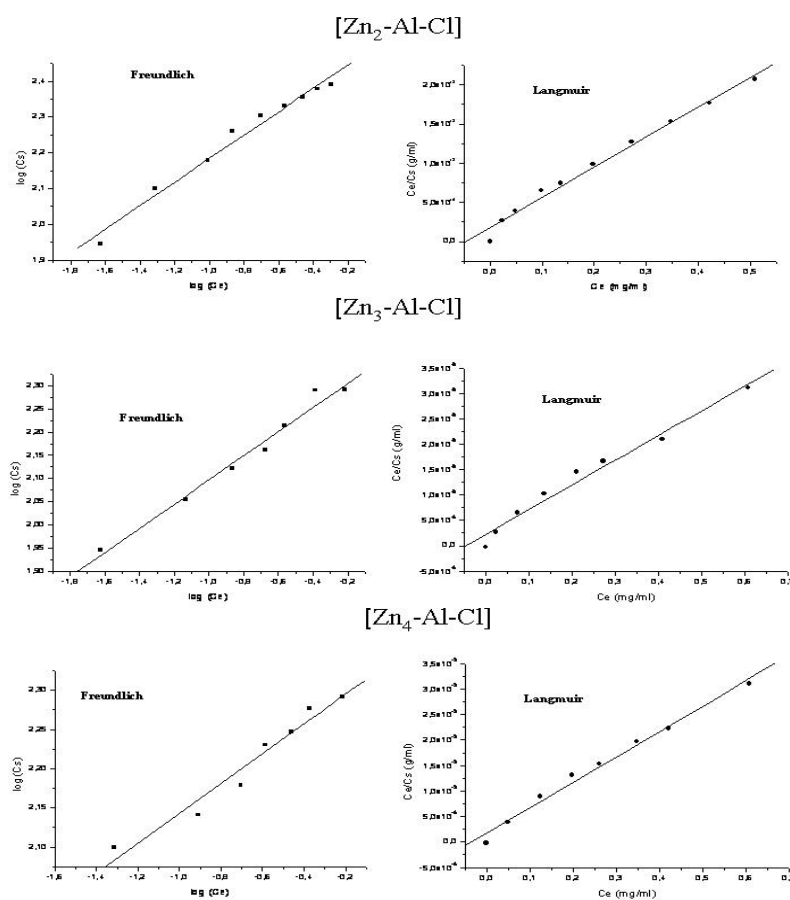


Figure 7 : Modélisation suivant les équations de Freundlich et le Langmuir pour les phases

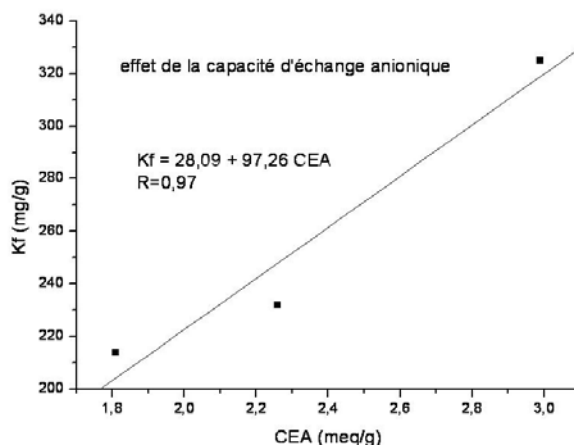
Ces deux modèles semblent convenir pour déterminer la capacité d'adsorption obtenue pour des  $C_e$  faibles puisqu'il présente un alignement des points. Cependant, le modèle théorique le mieux adapté concernant l'adsorption de l'uréase sur l'HDL est le modèle de Freundlich. En effet, les calculs basés sur le modèle de Langmuir supposent que chaque site ne peut fixer qu'une seule espèce adsorbée. Or, l'adsorption d'une molécule d'uréase sur les HDL occupe plusieurs sites. La surface libre de la phase  $[Zn_2-Al-Cl]$  est de  $24,6 \text{ \AA}^2/e$  ; La surface de l'enzyme est de  $90 \times 54 = 4860 \text{ \AA}^2$ . Si toute la surface de l'enzyme recouvre la matrice inorganique, elle occupe environ 197 sites d'adsorption. En outre, le modèle de Freundlich, bien qu'il soit empirique et adapté à l'adsorption de molécules plus petites que les macromolécules d'enzyme, se base sur une hétérogénéité de la surface et sur des interactions de molécules d'adsorbat. Ce modèle, le plus de la réalité, sera utilisé dans notre étude pour la détermination de la capacité d'adsorption de l'enzyme avec les HDL.

Les valeurs des capacités d'adsorption et des constantes  $L$  et  $n_f$  sont regroupées dans le Tableau 3.

**Tableau 3 : Paramètres de Freundlich et Langmuir et capacité d'échange anionique des phases étudiées**

Modèle matrice	Freundlich			Langmuir			CEA (meq/1g)
	$K_f$ (mg/g)	$n_f$	$r$	$C_m$ (mg/g)	$L$	$r$	
$[Zn_2-Al-Cl]$	325	3	0,988	260	21	0,99	2,99
$[Zn_3-Al-Cl]$	228	3,8	0,987	206	21,3	0,988	2,26
$[Zn_4-Al-Cl]$	215	5	0,978	201	27	0,994	1,81

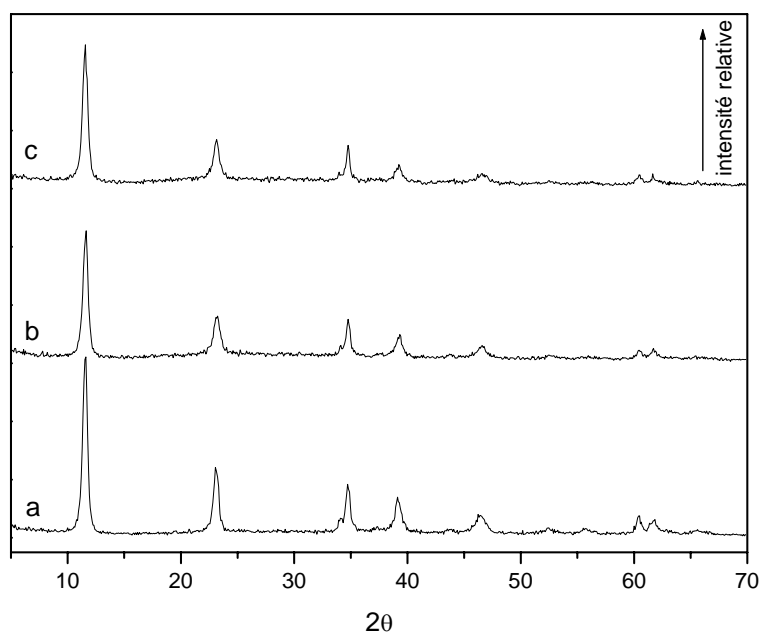
On observe une augmentation significative de la capacité d'adsorption avec la densité de charge des feuillets, directement liée au rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+}$ . Cet effet peut être aussi visualisé à travers la relation pratiquement linéaire ( $r = 0,97$ ) de  $K_f$  avec la capacité d'échange anionique (c.e.a.) (Figure 8). On en déduit par conséquent que les interactions uréase/HDL sont de nature électrostatique et que le mécanisme d'adsorption est sûrement un mécanisme d'échange anionique, comme cela a pu être montré pour d'autres types d'adsorbats (pesticides anioniques par exemple<sup>9</sup>).



**Figure 8 : Capacité d'adsorption en fonction de la capacité d'échange anionique**

Il est possible d'évaluer le taux d'échange à partir des masses d'uréase adsorbée sur HDL. On calcule le taux de groupements anioniques ( $-\text{COO}^-$ ) à la surface de l'enzyme rapporté à la masse adsorbée. Les groupements anioniques sont générés par les acides aminés aspartiques et glutamiques, totalement déprotonés dans la gamme de pH utilisé. Ces groupements sont situés en surface de la protéine et lui confère ses propriétés hydrophiles. Le taux d'échange de l'uréase calculé pour toutes les phases HDL est d'environ 20 %.

L'analyse des résidus solides d'adsorption par diffraction des rayons X ne révèle aucune expansion de la distance interlamellaire (Figure 9).

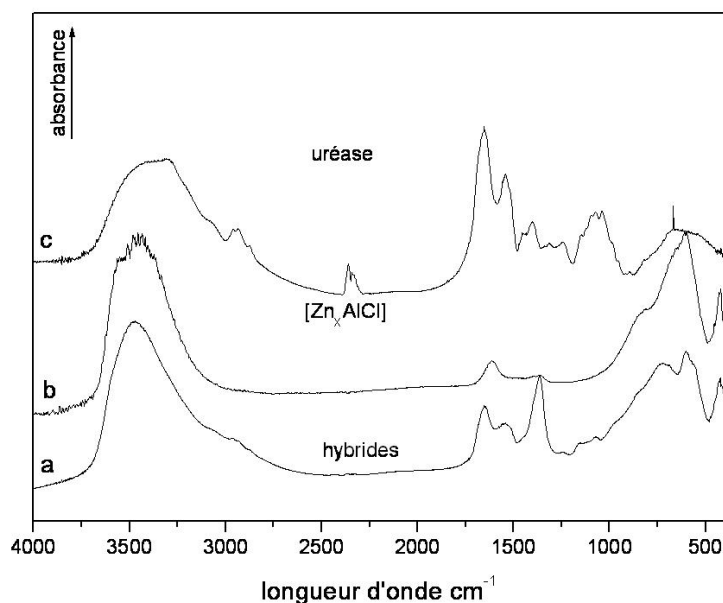


**Figure 9 : Diffractogrammes des rayons X pour a) la phase précurseur, b) et c) les phases avec une Ci de 0,5 et 2 mg/ml**

La taille de la biomolécule ( $90 \times 54 \times 63 \text{ \AA}^3$ ) est trop importante pour pouvoir s'insérer entre les feuillets de l'argile. On peut noter, toutefois, une diminution d'intensité des raies de diffraction. Ce résultat indique que l'adsorption de l'enzyme se fait aussi aux joints de grains et conduit à une plus grande dispersion des particules en solution. Cette dispersion conduit à la libération de nouveaux sites de surfaces et permet de rendre compte de l'isotherme d'adsorption à haute concentration.

Les spectres infrarouge correspondant à l'uréase et à la phase HDL  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  seules ainsi que la phase  $[\text{Zn}_3\text{-Al}]$  obtenue après adsorption d'uréase ( $C_i=1 \text{ mg/ml}$ ) ont été représentés sur la Figure 10.

Le spectre de l'uréase adsorbée à la surface de la phase HDL résulte de la superposition des spectres de l'uréase et de la matrice inorganique. Il est donc confirmé que l'uréase peut être immobilisée dans la matrice HDL. Cependant, l'apparition d'une bande à  $1360 \text{ cm}^{-1}$  et le dédoublement des bandes de vibration du réseau à  $647 \text{ cm}^{-1}$  révèlent la carbonatation de la phase HDL pendant l'incubation dans le réacteur fermé à l'air. Aucun déplacement des raies caractéristiques de l'uréase n'a été observé. Ce résultat confirme un mécanisme d'échange de surface lors de la rétention de la biomolécule avec les phases HDL sans détérioration de l'enzyme.



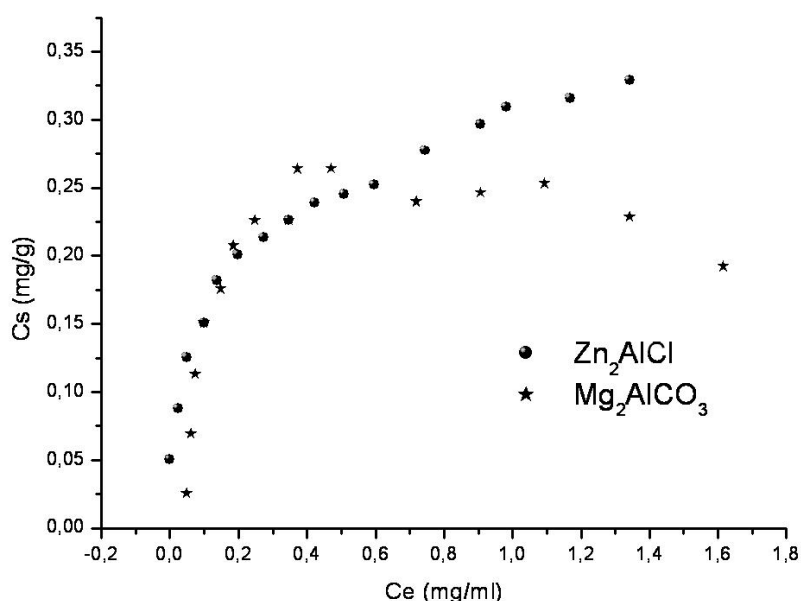
**Figure 10 : Spectroscopie infrarouge a) du matériau final obtenu après adsorption, b) du matériau de départ et c) de l'uréase**

### III.3.2 Effet de la matrice hôte

Les isothermes d'adsorption de l'uréase par les phases HDL  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  et  $[\text{Mg}_2\text{-Al-CO}_3]$  ont été étudiés et comparés (Figure 11). Les deux matrices HDL présentent des rapports  $M^{\text{II}}/M^{\text{III}}$  identiques, proches des valeurs attendues avec une meilleure cristallinité pour la phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  (Tableau 4)

**Tableau 4 : Analyses chimiques**

Phases	$M^{2+}/\text{Al}^{3+}$ théo	$M^{2+}/\text{Al}^{3+}$ exp	$\text{Cl}^-/\text{Al}^{3+}$	$\text{CO}_3^{2-}/\text{Al}^{3+}$	$(\text{Cl}^- + 2\text{CO}_3^{2-})/\text{Al}^{3+}$
$[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$	2	1,88	0,94	0,1	1,14
$[\text{Mg}_2\text{-Al-CO}_3]$	2	1,88	négligeable	0,56	1,12



**Figure 11 : Isothermes d'adsorption de l'uréase en fonction de type de matrice HDL**

Pour les faibles concentrations ( $C_e < 0,6 \text{ mg/ml}$ ), la phase  $[\text{Mg}_2\text{-Al-CO}_3]$  révèle une capacité d'adsorption plus importante engendrée par une capacité d'échange anionique élevée (Tableau 5). Les propriétés de surface ne sont pas mises en cause ici, car les aires spécifiques mesurées par la méthode BET sont similaires ( $40 - 42 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

Pour les concentrations supérieures ( $C_e > 0,6 \text{ mg/ml}$ ), le processus d'adsorption atteint ses limites pour la phase  $[\text{Mg}_2\text{-Al-CO}_3]$ . La présence d'anions carbonates à la surface des feuillets, difficiles à extraire dans des conditions d'échanges ioniques standard, est l'un des éléments défavorables à l'adsorption d'uréase par les HDL. L'augmentation de la concentration initiale en uréase ne permet plus de forcer une 2<sup>ème</sup> étape d'adsorption comme



pour les phases Zn-Al. On assiste même à un relargage d'enzyme bien que le pH d'équilibre soit plutôt favorable à l'adsorption.

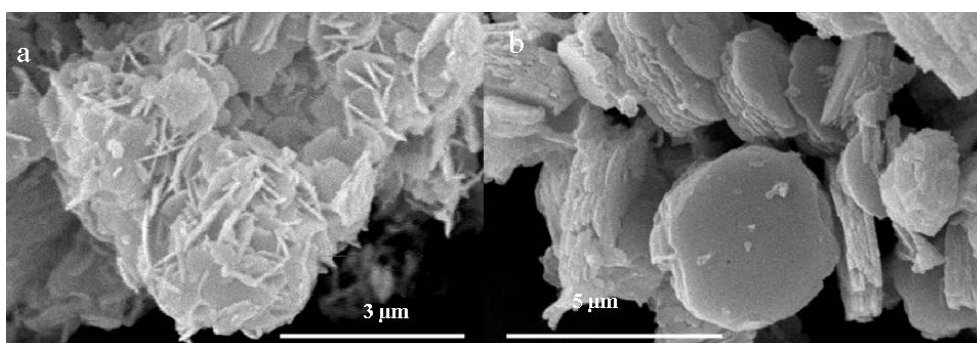
Pour des concentrations d'enzyme plus élevées en solution, la compétition entre les forces d'association hydrophobe enzyme-enzyme en solution et les forces d'adsorption hydrophiles Enzyme/HDL devient effective, favorable à l'adsorption pour les petites particules d'HDL et en faveur de l'agrégation uréase-uréase en solution pour les cristallites partiellement carbonatées.

**Tableau 5 : Paramètres de Freundlich, capacité d'échange anionique et surface spécifique des précurseurs**

Matrice	pH éq.	Modèle de Freundlich			CEA (meq/100g)	$S_{\text{BET}}$ (m <sup>2</sup> /g)
		K (mg/g)	n	r		
[Zn <sub>2</sub> -Al-Cl]	7,0	315	3	0,987	298,9	42
[Mg <sub>2</sub> -Al-CO <sub>3</sub> ]	8,0	407	2,2	0,964	407,0	40

### III.3.3 Effet de la morphologie de la matrice hôte

Nous avons, dans cette étude, évalué l'effet des propriétés morphologiques des phases HDL sur l'adsorption d'uréase. Grâce à l'utilisation de la méthode de synthèse par coprécipitation à pH constant et la méthode d'hydrolyse thermique de l'urée, nous avons pu moduler les tailles et formes de particules ainsi que leur état d'agréations (Figure 12). La méthode de coprécipitation conduit à la formation de petites plaquettes de forme pseudo-hexagonale dont la taille varie entre 400 et 800 nm et agrégée en rose des sables. La méthode urée produit des particules de taille supérieure (> 1  $\mu\text{m}$ ), faiblement agrégées. Ces différences texturales se traduisent par des surfaces spécifiques distinctes (40 et 5 m<sup>2</sup>/g respectivement, Tableau 7)

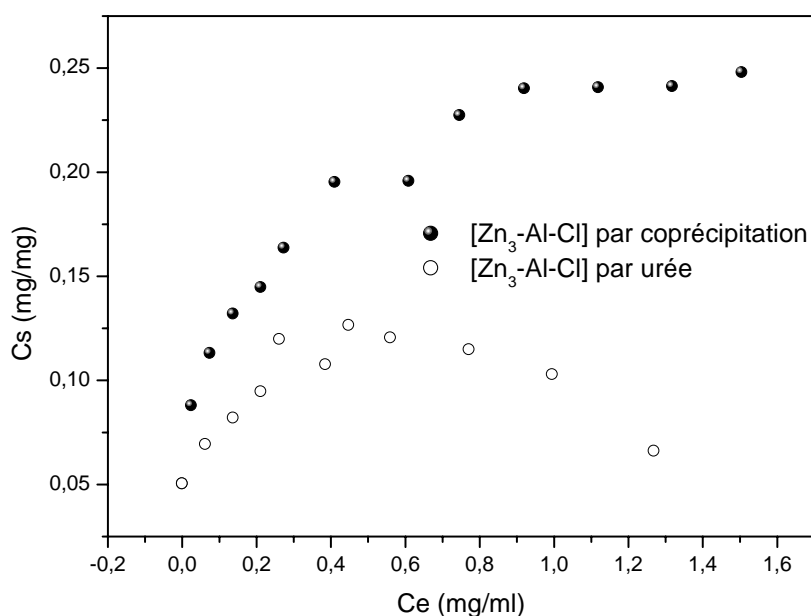


**Figure 12 : Clichés MEB a) phase coprécipitée, b) phase préparée par hydrolyse thermique de l'urée**

L'enregistrement des isothermes a été réalisé pour la phase  $[Zn_3-Al-Cl]$  préparée selon ces deux modes de synthèse (Figure 13). Il est à noter que la phase HDL préparée par le second procédé possède un taux de carbonatation plus important et un rapport Zn/Al plus faible (Tableau 6).

**Tableau 6 : Analyses chimiques**

Phases	Mode de synthèse	théo Zn/Al	exp Zn/Al	$Cl^-/Al^{3+}$	$CO_3^{2-}/Al^{3+}$	$(Cl^-+2CO_3^{2-})/Al^{3+}$
$[Zn_3-Al-Cl]$	urée	3	1,95	0,55	0,28	1,11
$[Zn_3-Al-Cl]$	coprécipitation	3	2,97	1,06	0,11	1,28



**Figure 13 : Isothermes d'adsorption de l'uréase par des phases  $[Zn_3-Al]$  préparées par coprécipitation et thermohydrolyse de l'urée.**

Les paramètres de Freundlich ont été évalués pour les concentrations d'équilibre,  $C_e$ , inférieures à 0,6 mg/ml (Tableau 7). La diminution de la capacité d'adsorption de la phase  $[Zn_3-Al-Cl]$  synthétisée par la méthode urée est liée à la diminution de la surface spécifique du matériau et à la carbonatation partielle de la phase. L'effet tampon des deux matrices  $[Zn-Al-Cl]$  n'est pas le même selon les méthodes de préparation comme l'indiquent les valeurs différentes de pH d'équilibre. Les charges et potentiels de surface des particules semblent très sensibles à la nature des contre-anions et aux effets de taille. La phase HDL préparée par hydrolyse de l'urée tamponne la solution à des valeurs de pH beaucoup plus acides (6,0), pH moins favorables à l'adsorption d'uréase. Dans les deux cas, la constante  $n_f$  indique que

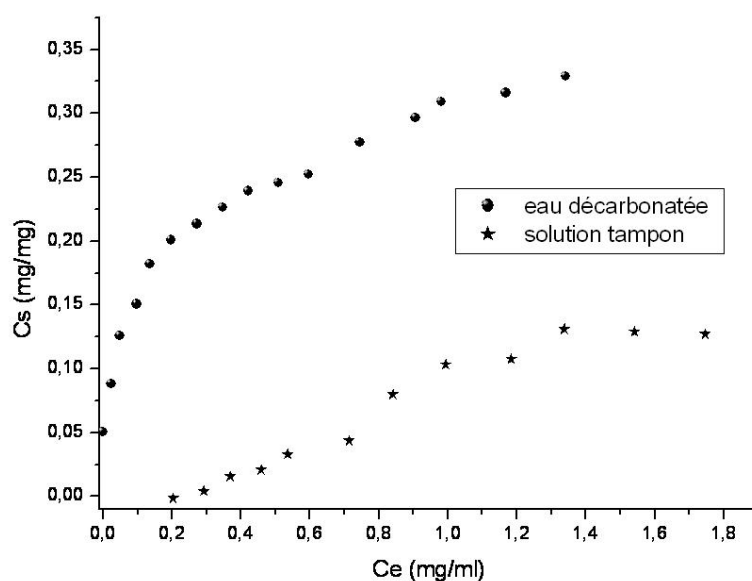
l'uréase a une bonne affinité pour les différentes matrices mais plus particulièrement avec la phase préparée par coprécipitation.

**Tableau 7 : Paramètres de Freundlich et surface spécifique des précurseurs**

Matrice	pH eq.	Modèle de Freundlich			$S_{\text{BET}}$ (m <sup>2</sup> /g)
		K (mg/g)	n	r	
Zn <sub>3</sub> AlCl cop	7,0	228	3,8	0,989	40
Zn <sub>3</sub> AlCl urée	6,0	135	4,1	0,996	5

### III.3.4 Effet de la solution tampon

Les milieux biologiques naturels sont des milieux généralement tamponnés riches en phosphates, c'est pourquoi les mesures d'activités biologiques se font la plupart du temps dans des tampons phosphate, proches de la neutralité en pH. Nous avons donc étudié l'effet de la force ionique, générée par un tampon NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de concentration 0,1 M à pH=7,4 sur l'adsorption d'uréase. Cette étude est comparée à l'adsorption de l'uréase dans une solution d'eau décarbonatée. Les courbes (Figure 14) révèlent des résultats différents d'adsorption en fonction du milieu utilisé. Les différents paramètres  $K_f$  et  $n_f$  sont récapitulés dans le Tableau 8. Contrairement aux études effectuées avec de l'eau décarbonatée (isotherme type L), l'isotherme d'adsorption obtenu avec une solution contenant des ions phosphates est de type S. L'allure de la courbe traduit une compétition entre la solution phosphate et l'uréase au niveau des sites d'adsorption.



**Figure 14 : Isotherme d'adsorption en fonction du solvant utilisé**

Tableau 8 : Paramètres de Freundlich

matrice	pH equ.	Modèle de Freundlich		
		K (mg/g)	n	r
Zn <sub>2</sub> AlCl	7	315	3	0,987
Zn <sub>2</sub> AlCl (tampon)	7,4	130	0,39	0,999

Les diffractogrammes des rayons X (Figure 15) montrent une augmentation de la distance interlamellaire de 0,75 nm à 1,10 nm, provoquée par un échange anionique total des anions originels (Cl<sup>-</sup>) par les anions phosphates (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) de la solution tampon. Toutefois, cet échange n'empêche pas l'adsorption d'uréase, il la limite tout au plus. Les ions phosphates préviennent même le relargage de l'enzyme à plus forte concentration.

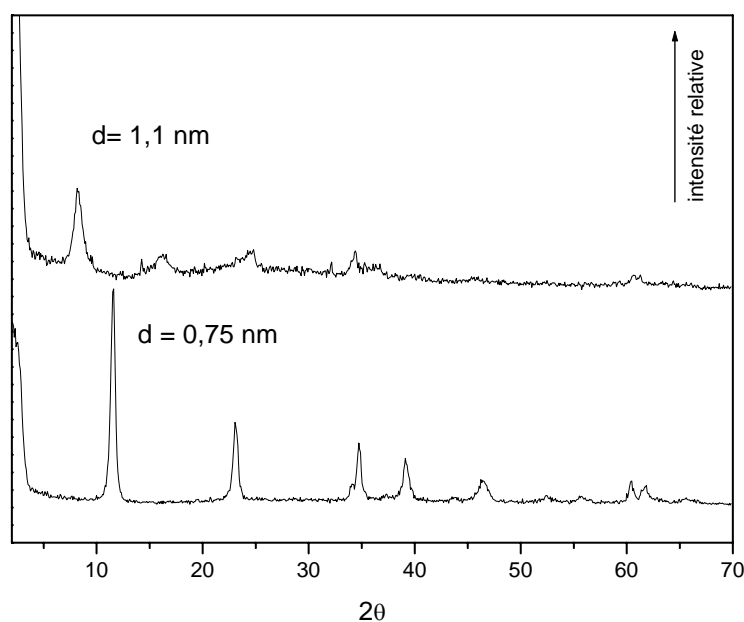


Figure 15 : Diffractogrammes des rayons X du précurseur HDL et de la phase hybride (uréase/HDL) en présence de la solution tampon phosphate (Ci = 1 mg/ml)

#### IV Désorption de l'uréase

L'immobilisation d'enzymes dans des matrices inorganiques de type laponite ou bien de polymères organiques pour la réalisation d'électrodes ou de capteurs nécessite très souvent une étape de réticulation par le glutaraldéhyde afin de fixer irréversiblement les biomolécules. Cette réticulation peut altérer partiellement l'activité de l'enzyme ou bien modifier la

diffusion du substrat. Afin de montrer l'intérêt des HDL comme structures d'immobilisation des enzymes nous avons évalué leur capacité de désorption de l'uréase dans différentes conditions d'équilibre.

#### IV.1 Protocole Expérimental

Après l'adsorption de l'uréase avec la matrice  $[Zn_2-Al-Cl]$  pour un temps de contact de 24 heures, la solution est centrifugée afin de séparer l'enzyme adsorbée sur le solide et l'enzyme libre en solution. 5 ml de surnageant est ensuite prélevé et remplacé soit par 5 ml d'eau décarbonatée soit par le même volume de tampon phosphate (0,1 M et pH=7,4). L'expérience a été réalisée à différents points de la concentration initiale (0,1 à 1 mg/ml) à 23°C. Le temps de contact est d'une durée de 24 heures dans le but de favoriser la désorption maximale de l'enzyme immobilisée. Le mélange réactionnel est centrifugé à 10000 tours pendant 20 minutes. Le surnageant est dosé par spectroscopie UV-Visible à 275 nm pour déterminer la quantité d'uréase relarguée.

#### IV.2 Résultats expérimentaux

##### IV.2.1 Effet de désorption avec l'eau décarbonatée

Le graphe (Figure 16) ci-dessous montre les courbes d'adsorption et de désorption de l'uréase dans l'eau.

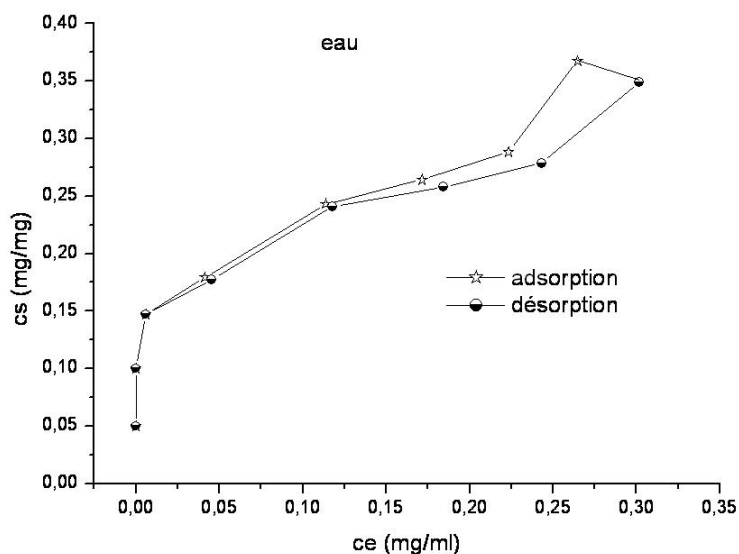


Figure 16 : Isothermes d'adsorption et de désorption de l'uréase par la phase  $[Zn_2-Al-Cl]$

La courbe de désorption est légèrement décalée à concentrations élevées et rejoint la courbe d'adsorption à faibles concentrations. La quantité d'uréase libérée lors des désorptions effectuées dans l'eau correspond aux biomolécules faiblement retenues (multicouches d'uréase) sur la surface de l'argile. Ces courbes confirment le mécanisme de rétention de l'uréase par chimisorption ou échange d'anions proposé précédemment

#### IV.2.2 Désorption de l'uréase avec une solution de tampon phosphate

La présence de tampon phosphate favorise la désorption de l'enzyme (Figure 17). L'affinité de la matrice HDL pour les phosphates entraîne son adsorption et libère les molécules d'uréase. Le phénomène est accentué pour les concentrations élevées en tampon phosphate mais existent aussi à faibles concentrations.

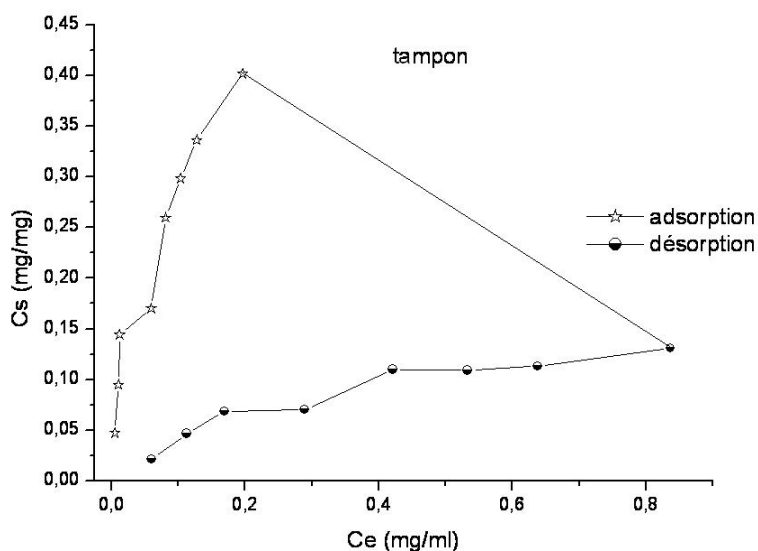


Figure 17 : Isothermes d'adsorption et de désorption de l'uréase par la phase  $[Zn_2-Al-Cl]$  avec une solution phosphate

La diffraction des rayons X (Figure 18) est en accord avec les observations puisque l'expansion de la distance interlamellaire ( $d = 10,8 \text{ \AA}$ ) révèle la présence des ions phosphates entre les feuillets. L'intercalation par échange provoque une désorganisation de la structure lamellaire de l'HDL.

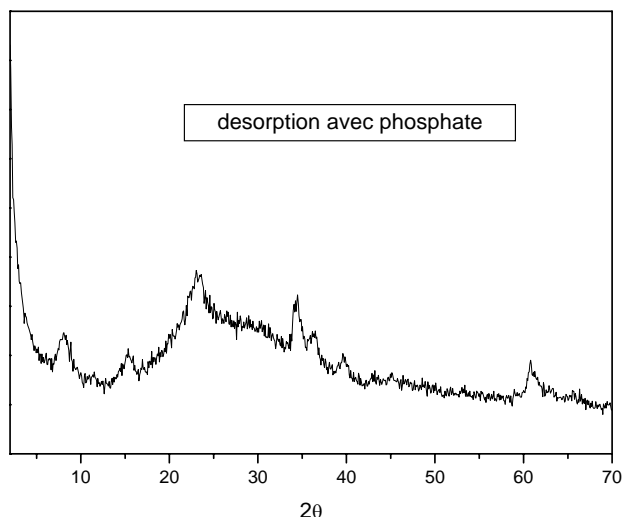


Figure 18 : Diffractogramme des rayons X du matériau après désorption (Ci=1mg/ml)

## V Conclusion

L'adsorption d'uréase sur les hydroxydes doubles lamellaires révèle une haute affinité. L'enzyme se fixe à la surface externe du matériau avec un taux d'échange de 20 %. La taille trop encombrante de l'enzyme empêche son intercalation dans les domaines interlamellaires de la structure HDL. Les études réalisées ont montré que les propriétés d'adsorption et la quantité d'uréase immobilisée dépendaient de différents paramètres. L'amélioration des propriétés telles que la capacité d'échange anionique liée au rapport ( $M^{II}/M^{III}$ ), la surface spécifique de l'argile ainsi que l'utilisation d'un  $pH \gg p.i.e$  de l'enzyme favorise l'adsorption. Par contre, la présence d'anions dont l'affinité avec la phase HDL est plus appréciable (anions carbonates, anions phosphates) concurrence l'adsorption de l'enzyme.

Dans un premier temps, l'enzyme est adsorbée à la surface de la matrice grâce aux interactions électrostatiques issus des acides aspartiques, glutamiques, des groupements carboxylates terminaux et à des interactions hydrophiles (Figure 19). Dans le cas des phases chlorées, un excès d'enzyme en solution entraîne une modification texturale qui va entraîner une désagrégation des particules libérant de nouveaux sites d'adsorption, de même nature que les précédents. Cette augmentation de la surface spécifique favorise une nouvelle adsorption. Ce comportement est accentué pour les phases présentant des capacités d'échange importantes.

Par contre dans le cas des phases carbonatées, la forte affinité des HDL pour ces anions empêche la désagrégation des particules. Par conséquent, aucun nouveau site d'adsorption n'apparaît. L'excès d'enzyme vient se fixer sur la première couche d'uréase créant des liaisons hydrophobes entre les deux biomolécules et provoquant le relargage de l'enzyme en solution.

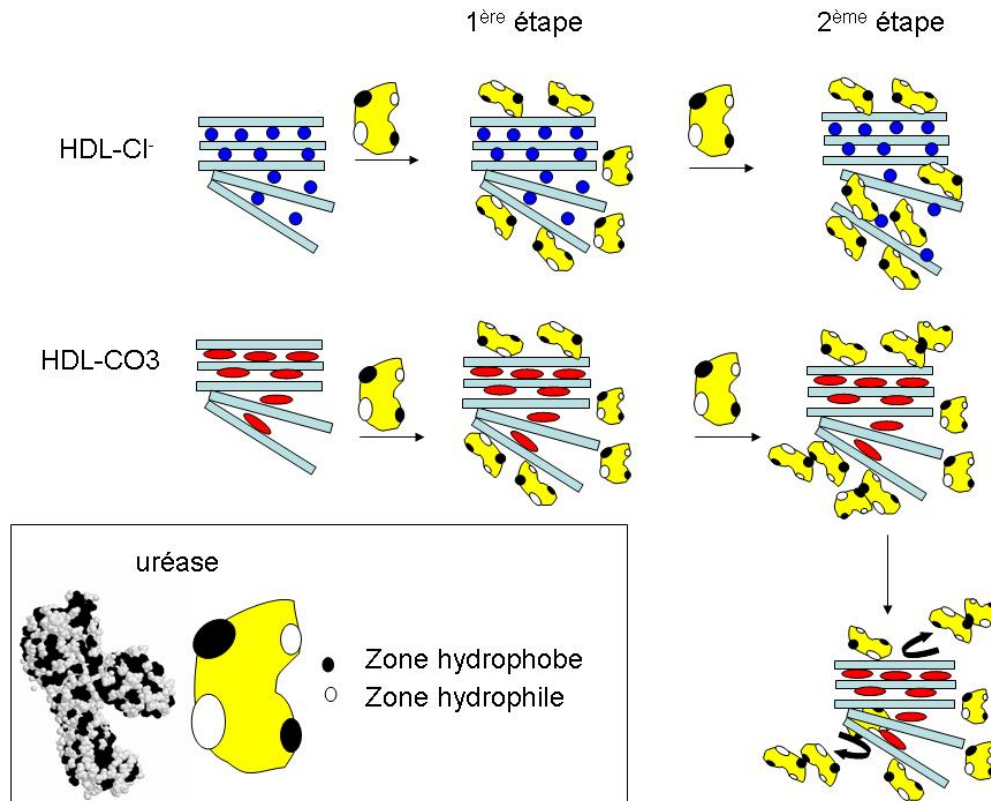


Figure 19 : Schéma représentatif des mécanismes d'adsorption

La présence d'anions phosphates issus de la solution tampon provoque une compétition avec l'enzyme entraînant soit une diminution de la quantité adsorbée soit le relargage de l'enzyme immobilisée.





## **Chapitre 4**

# **Etude du confinement de l'uréase dans des matrices HDL [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl]**



## Sommaire

<b>I</b>	<b><i>Introduction</i></b> .....	<b>157</b>
<b>II</b>	<b><i>Etude Bibliographique</i></b> .....	<b>157</b>
<b>III</b>	<b><i>Stratégie de confinement de l'uréase</i></b> .....	<b>162</b>
<b>III.1</b>	<b><i>Protocoles expérimentaux des synthèses des matériaux hybrides HDL [Zn<sub>3</sub>Al]- uréase</i></b>	<b>162</b>
III.1.1	<i>L'échange anionique</i> .....	162
III.1.2	<i>La délamination</i> .....	162
III.1.3	<i>Coprécipitation</i> .....	163
<b>III.2</b>	<b><i>Comparaison des propriétés structurales et morphologiques des différentes phases [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl]-Uréase</i></b> .....	<b>163</b>
III.2.1	<i>Etude structurale</i> .....	163
III.2.1.1	Diffraction des rayons X sur poudre .....	163
III.2.1.2	Spectroscopie infrarouge .....	165
III.2.2	<i>Etude morphologique par microscopie électronique à balayage</i> .....	167
<b>III.3</b>	<b><i>Etude approfondie de la coprécipitation des phases [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl]-Urease</i></b> .....	<b>170</b>
III.3.1	<i>Résultats expérimentaux</i> .....	170
III.3.2	<i>Etude structurale</i> .....	173
III.3.2.1	Diffractions des rayons X.....	173
III.3.2.2	Etude par absorption des rayons X.....	176
III.3.2.3	Spectroscopie infrarouge .....	184
III.3.2.4	Spectroscopie UV-visible.....	185
III.3.3	<i>Etude morphologique</i> .....	189
III.3.3.1	Perméabilité des phases hybrides HDL/Uréase coprecipitées .....	189
III.3.3.2	Microscopie électronique à balayage .....	191
III.3.3.1	Microscopie électronique à transmission .....	193
<b>IV</b>	<b><i>Conclusion</i></b> .....	<b>194</b>



## *I Introduction*

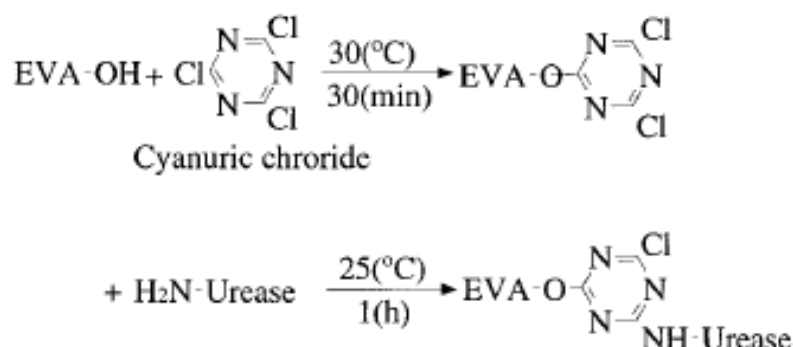
L'immobilisation d'enzymes sur HDL par le procédé d'adsorption solide/liquide est une méthode efficace pour préparer des matériaux nanohybrides Enzymes/HDL. Dans le cas de l'adsorption d'uréase sur [Zn-Al-Cl], cette méthode permet au mieux d'adsorber 0.35 mg d'enzyme par gramme de solide. L'adsorption se fait à la surface des cristallites. Les particules d'HDL conservent globalement leur intégrité structurale. L'adsorption modifie principalement l'état de surface et d'aggrégation des cristallites. Afin d'améliorer la quantité d'uréase immobilisée dans la matrice HDL et de préparer un véritable matériau nanohybride basé sur l'association intime mono-feuillet HDL/Enzyme, nous avons utilisé les procédés de chimie douce permettant soit la préparation directe des matériaux hybrides (méthode de coprécipitation, précipitation des HDL par l'uréase), soit la nanostructuration HDL/Enzymes par auto-assemblage en solution (méthode de délamination/réaggrégation et calcination/reconstruction).

Ces méthodes de préparation sont toutes réalisées dans des conditions douces (pH neutres, température ambiante) favorables à la protection des propriétés biologiques de l'enzyme. Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à comparer les performances des différents procédés de synthèse pour la phase [Zn<sub>3</sub>-Al]-Uréase avec un rapport massique  $Q = \text{uréase}/\text{HDL} = 1$ . Dans une deuxième étape, nous avons cherché les conditions optimales de coprécipitation de matériaux bio-hybrides.

## *II Etude Bibliographique*

Cette étude porte sur les différents modes d'immobilisation de l'uréase tels que le couplage covalent, le piégeage par inclusion dans un gel, l'encapsulation, et l'enrobage de l'uréase sur des capsules par la méthode couche par couche. Les résultats discutés dans la littérature se basent essentiellement sur les activités enzymatiques de l'uréase immobilisée. La quantité confinée lors de différents procédés n'est pas toujours donnée. Ce paragraphe regroupe en fait les différentes méthodes qui ont été utilisées pour immobiliser l'uréase qui feront l'objet d'une discussion sur l'activité enzymatique au chapitre 6.

L'uréase a été immobilisée sur des polymères fonctionnalisés afin de permettre le couplage covalent entre l'enzyme et la matrice. L'agent de fonctionnalisation utilisé est le chlorure de cyanuryle<sup>1</sup>. Il réagit dans un premier temps avec les groupements hydroxyles du polymère, puis avec les groupements amines de l'uréase par élimination d'acide chlorhydrique (Figure 1). Les conditions optimales pour l'immobilisation ont été déterminées en fonction de la concentration en chlorure de cyanuryle, de la concentration initiale d'uréase et de l'activité spécifique.



**Figure 1 : Activation de la membrane polymère par du chlorure de cyanure<sup>1</sup>**

Une autre étude<sup>2</sup> concerne l'immobilisation de l'uréase sur des membranes fonctionnalisées avec des groupements amine primaire, amine tertiaire, amide, amidoxime et hydrazide. La quantité d'uréase immobilisée dépend à la fois de la quantité et de la nature des groupements associés à la membrane. La fonctionnalisation par les groupements (NH<sub>2</sub>, COOH), (NH<sub>2</sub>, NR<sub>3</sub>) et (NR<sub>2</sub>, NR<sub>3</sub>, COOH) ont montré une amélioration de quantité d'enzyme greffée. Cependant, leur activité est faible. En fait, l'activité enzymatique de l'urée dépend essentiellement de la perméabilité de la biomembrane. Les résultats ont montré une activité relative de 68% et de 34 % pour des membranes de perméabilité égales 4,3 et 0,2 10<sup>10</sup> m<sup>3</sup> m<sup>-2</sup> h<sup>-1</sup> Pa<sup>-1</sup>, respectivement. Une fois la membrane activée, un agent extenseur comme le glutaraldéhyde peut être utilisé pour améliorer le degré de liberté de l'enzyme et par conséquent son activité. L'activité relative de l'uréase immobilisée sur une membrane modifiée avec de l'éthylènediamine est de 51%. En utilisant, le glutaraldéhyde elle monte à 65%. Il a été démontré dans cette étude que l'immobilisation dans ces matrices altérerait les propriétés biologiques de l'uréase. Le pH optimum de l'uréase libre est de 5,8. Lorsque l'uréase est immobilisée sur les membranes chargées positivement, le pH optimal se déplace vers les faibles valeurs de pH, inversement si la membrane d'immobilisation est chargée négativement. Alors que cette technique a l'avantage d'immobiliser irréversiblement l'uréase, le mode de liaison conduit à une

<sup>1</sup> T. Miyata, A. Jikihara, K. Nakamae, J. Applied. Polymer Science, 1997, 1579-1588,

<sup>2</sup> T. Godjevargova, K. Gabrovska, J. Biotechnology, 103, 2003, 107-111

modification de la conformation de la protéine et à une perte d'activité. L'engagement des sites actifs de l'enzyme dans la liaison Enzyme/Membrane est même invoqué. Toutefois cette diminution d'activité enzymatique est compensée par une amélioration de la stabilité vis à vis du pH, de la température et du stockage.

L'utilisation de matrices polymères organiques offre l'avantage de présenter une porosité flexible et adaptable aux dimensions de la biomolécule. Lors du piégeage dans ces matrices, l'enzyme, de poids moléculaire élevé, est confinée à l'intérieur des pores alors que le substrat et les produits de la réaction enzymatique, de masses moléculaires inférieures, diffusent facilement à travers la matrice. L'uréase a été immobilisée dans diverses matrices polymériques<sup>3</sup> pour lesquelles la densité de réticulation, la porosité, la structure chimique, la résistance mécanique du polymère ont été modifiées afin d'obtenir un bon compromis entre diffusion du substrat et prévention du relargage de l'enzyme. Une étude<sup>4</sup> a été réalisée sur l'influence de la nature des polymères. Cette nouvelle approche d'immobilisation est basée sur le piégeage dans un polymère neutre ou cationique, dont les propriétés hydrophiles permettent de préserver intégralement les propriétés fonctionnelles et biologiques des molécules d'uréase immobilisées. La suspension de latex a été obtenue par dissolution du polymère dans un mélange eau/éthanol puis ajoutée à une solution d'uréase. Le caractère hydrophile de la matrice et la présence de contre-ions dans le cas des polymères cationiques favorise les interactions avec la biomolécule et augmente la stabilité.

Les silices préparées par voie Sol-Gel peuvent être considérées comme des polymères inorganiques et ainsi utilisées pour l'immobilisation d'enzymes. En effet, ce sont des matrices à porosité modulable, physiquement rigides, chimiquement inertes, thermiquement stables, de transparence optique. Elles offrent la possibilité d'immobiliser des biomolécules sensibles à la chaleur, de piéger une grande quantité d'enzyme sans modifier leur conformation. Ces caractéristiques permettent d'élaborer une variété de biocapteurs optiques<sup>5</sup>, ampérométriques<sup>6</sup>, voire conductimétriques<sup>7</sup>. L'uréase a pu être immobilisée dans une matrice de silice par le procédé sol-gel. La procédure consiste dans un premier temps à hydrolyser le tétraméthoxysilane TMOS pour former un sol puis à ajouter une solution d'uréase. Enfin, le gel se forme. Les conditions de préparation telles que le temps de gélation, la porosité, la

<sup>3</sup> H. Demircioglu, H. Beyenal, A. Tanyolaç, N. Hasirci, *Polymer*, 36 (21), 1995, 4091-4096,

<sup>4</sup> H. Barhoumi, N. Jaffrezic-Renault, *Biosensors and Bioelectronics*, 2004

<sup>5</sup> H. C. Tsai, R.A. Doong, H.C. Chiang, K.T. Chen, *Analytica Chimica Acta*, 481, 2003, 75-84

<sup>6</sup> K. Ogura, K. Nakaoka, M. Nakayama, M. Kobayashi, A. Fujii, *Analytica Chimica Acta*, 384, 1999, 219-225

<sup>7</sup> W.Y. Lee, K. S. Lee, T.H. Kim, M.C. Shin, J.K. Park, *Electroanalysis*, 12 (1), 2000, 78-82



morphologie peuvent influencer les propriétés de l'enzyme. L'enzyme immobilisée est thermiquement plus stable que l'enzyme libre et le biocapteur a montré une bonne reproductibilité et une stabilité au stockage.

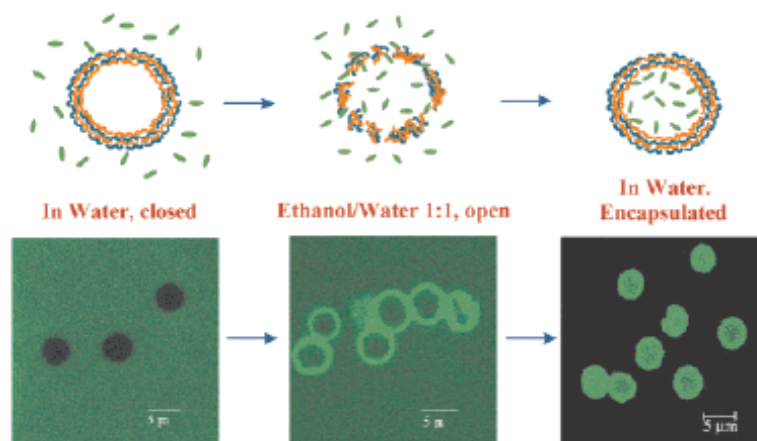
Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'encapsulation permet de retenir à l'intérieur d'un noyau de confinement liquide l'enzyme dissoute ou en suspension et de la préserver. Les billes d'alginate ont beaucoup été utilisées pour ce type d'immobilisation. Le réseau alginate peut être formé par réaction d'un cation divalent Ca<sup>2+</sup> avec de l'acide alginique. Il se forme alors des capsules. Pour améliorer l'obtention de sphères uniformes<sup>8</sup>, cette matrice peut être renforcée par un autre polysaccharide : le xanthane. Cependant, les gels d'alginate présentent des distributions de pores larges qui entraînent non seulement la fuite de petites molécules d'enzyme mais aussi l'accès à des molécules indésirables. Même si la taille de l'uréase est suffisamment importante pour ne pas diffuser à travers la membrane, des protéases peuvent traverser et venir désactiver l'enzyme. Par exemple, la chymotrypsine est une enzyme qui hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau des sites de division leucine, isoleucine, valine et histidine. Il est donc nécessaire de protéger<sup>9</sup> contre la chymotrypsine la jack bean uréase qui possède tous ces acides aminés dans la région du site actif. Pour écarter ce problème, le chitosan, un polysaccharide cationique soluble dans l'eau, a été utilisé. Ce composé vient remplacer les ions Ca<sup>2+</sup> en formant une réticulation chitosan-alginate. L'enzyme encapsulée est plus stable vis-à-vis du pH, de la température et de la désactivation par les protéases.

Une autre méthode<sup>10</sup> d'encapsulation de l'uréase dans des micro-capsules assemblées par la méthode couche par couche a été élaborée. La procédure consiste à préparer un agent structurant en latex de 5 µm par couches successives de polycations et polyanions. Les capsules sont imperméables dans l'eau mais deviennent perméables dans un mélange eau/éthanol. De ce fait, elles ont été dissoutes dans ce mélange pour permettre l'insertion de l'enzyme puis sont mises en suspension à nouveau dans l'eau (Figure 2). Les propriétés de la membrane permettent de maintenir l'enzyme, de laisser diffuser les petites molécules et de protéger l'uréase des protéases et des microbes.

<sup>8</sup> Y. M. Elçin, *Biomaterials*, 16, 1995, 1157-1161

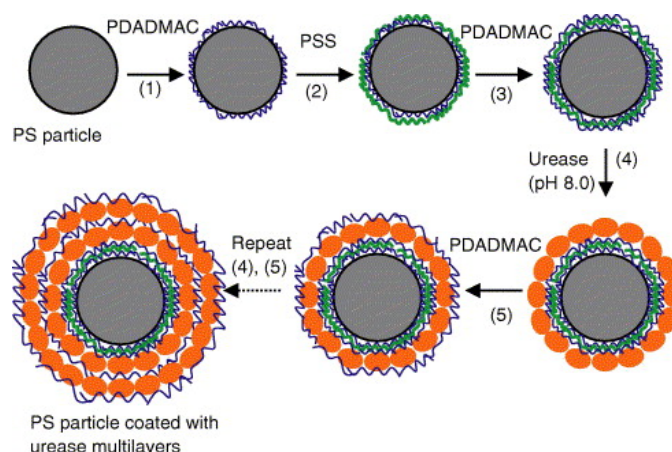
<sup>9</sup> A. R. DeGroot, R. J. Neufeld, *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 2001, 321-327

<sup>10</sup> Y. Lvov, *Nano Letters*, 1 (3), 2001, 125-128



**Figure 2 : Pénétration et encapsulation de l'uréase dans des capsules formées de multicouches de polyions, à gauche : dans l'eau, au milieu : dans eau/éthanol, à droite : la capsule avec l'uréase encapsulée dans l'eau. Schéma du dessous : images de fluorescence confocale des capsules<sup>10</sup>**

Ces exemples ont montré la possibilité d'encapsuler l'enzyme à l'intérieur des capsules mais il est possible aussi d'immobiliser l'uréase à l'extérieur des micro-sphères. Des multicouches d'uréase<sup>11, 12</sup> ont été assemblées sur des sphères de polymères par adsorption successive d'uréase avec un polyélectrolyte de charge opposée par la méthode couche par couche (Figure 3). Comme l'uréase possède un point isoélectrique de 5,3, il est possible de l'utiliser comme polycation ou polyanion en fonction du pH utilisé. Cependant cette méthode présente des inconvénients : une faible quantité d'uréase est immobilisée et une perte d'activité, probablement par changement de conformation, est enregistrée.



**Figure 3 : Formation des capsules enrobées de polyions (uréase/polyélectrolyte) par la méthode couche par couche**

<sup>11</sup> Y. Lvov, F. Caruso, Analytical Chemistry, 73, 2001, 4212-4217

<sup>12</sup> Z. Liang, C. Wang, Z. Tong, W. Ye, S. Ye, Reactive and Functional Polymers, 2005, article in Press

### ***III Stratégie de confinement de l'uréase***

#### ***III.1 Protocoles expérimentaux des synthèses des matériaux hybrides HDL [Zn<sub>3</sub>Al]-uréase***

##### ***III.1.1 L'échange anionique***

La méthode utilisée est identique à celle réalisée pour l'adsorption de l'enzyme sur les phases HDL (Chapitre III). 20 mg de [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] sont mis en suspension dans 10 ml d'une solution d'uréase à 2 mg/ml dans un système fermé. Le rapport massique initial uréase/HDL est de 1 (Q=1). Le mélange est alors agité pendant 24 heures dans un bain thermostaté à 23°C puis centrifugé à 10000 tours/min pendant 20 minutes pour séparer l'enzyme immobilisée de l'enzyme libre. Les conditions de préparation du matériau par échange ionique sont identiques en terme de concentration d'uréase et de rapport massique Uréase/HDL aux conditions utilisées pour générer le dernier point de l'isotherme d'adsorption.

##### ***III.1.2 La délamination***

La méthode de délamination que nous avons utilisée correspond à la méthode élaborée au laboratoire (chapitre I, section IV.2.1).

Les conditions expérimentales sont les suivantes : une phase [Zn<sub>3</sub>-Al-DDS] a été préparée par coprécipitation d'une solution de chlorure de zinc et d'aluminium avec un rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+} = 3$  et de concentration 1M dans un excès de DDS tel que  $DDS/Al^{3+} = 2$ . La synthèse a été réalisée à pH constant égal à 8 par ajout simultané de soude 2M. Le milieu réactionnel est mis sous azote pour éviter la carbonatation et agité pendant 48 heures. Le précipité obtenu est lavé à l'eau, pour éliminer les sels en excès (DDS) ( $V_{lav.} = 90$  mL), puis successivement avec de l'éthanol et du butanol pour enlever toutes traces d'eau et favoriser la mise en suspension ultérieure dans du butanol.

50 mL de suspension fraîche HDL/butanol à 1mg/ml sont mis sous ultrason pendant une heure pour favoriser la dispersion des particules dans ce solvant. Enfin, la solution a été placée sous reflux pendant 24 heures à 120°C pour permettre l'exfoliation des particules d'HDL. La dispersion totale des particules n'est pas toujours reproductible, elle dépend de plusieurs paramètres qui ne sont pas toujours maîtrisés, l'état de cristallinité du précurseur [Zn<sub>3</sub>-Al-DDS] ou son taux d'hydratation.

Pour préparer la phase hybride [Zn<sub>3</sub>-Al-DDS]-Uréase, une solution de 10 ml d'eau décarbonatée contenant 50 mg d'uréase a été ajoutée à la solution refroidie d'HDL. Le caractère hydrophile de la matrice inorganique permet son transfert de phase vers la solution aqueuse d'enzyme. La solution est agitée 24 heures sous atmosphère inerte. Le précipité obtenu est lavé jusqu'à disparition complète du butanol, puis séché à température ambiante.

### *III.1.3 Coprécipitation*

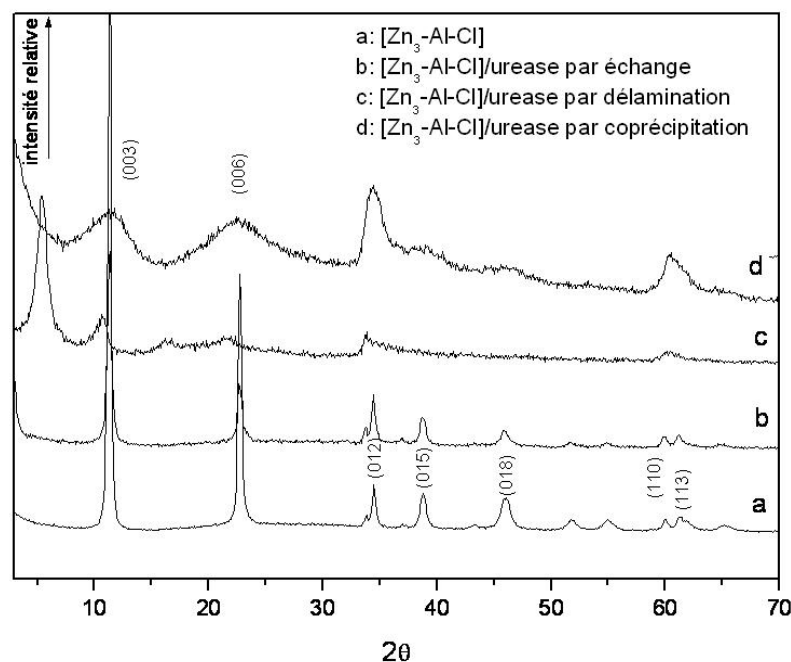
Le protocole est le suivant : 23 ml d'une solution de sels métalliques de ZnCl<sub>2</sub> et AlCl<sub>3</sub> de concentration totale 0,02 mol/L avec un rapport  $M^{II}/M^{III} = 3$  est additionné à une solution d'uréase (50 mg). Le rapport massique théorique uréase/HDL est de 1. Simultanément, une solution de soude à 0,04 M est ajoutée à vitesse constante afin d'obtenir un pH de consigne constant tout au long de la réaction de 8. La synthèse a lieu à température ambiante et sous azote pendant 24 heures. Le précipité est récupéré par centrifugation et lavé à l'eau décarbonatée ( $V_{lav.} = 60$  mL) puis séché à température ambiante.

## ***III.2 Comparaison des propriétés structurales et morphologiques des différentes phases [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl]-Uréase***

### *III.2.1 Etude structurale*

#### *III.2.1.1 Diffraction des rayons X sur poudre*

Les diffractogrammes des composés obtenus sont représentés sur la Figure 4. La présence des raies de diffraction caractéristiques de la structure HDL sur les diffractogrammes des différentes phases préparées valident l'utilisation des différentes méthodes de synthèse pour la préparation de phases hybrides [HDL]-Uréase. Cependant les résultats cristallographiques montrent des différences importantes.



**Figure 4 : Diffactogrammes X a) précurseur [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl], b) phase échangée, c) phase délamainée-reconstruite, d) phase coprécipitée.**

Lors de l'échange anionique, l'allure du diffractogramme est peu altérée. Les paramètres de maille affinés sont proches de ceux du précurseurs (Tableau 1 ). Un léger déplacement des raies (00l), indiquant une distance interlamellaire de 0,77 nm, dénote une légère contamination par les carbonates. Seules les intensités diffractées s'effondrent montrant un pourcentage de phase cristallisée plus faible dans la phase traitée par l'enzyme. La biomolécule s'échange à la surface et diffuse entre les particules, force la dispersion quand celle ci est énergétiquement accessible. En effet, les raies de diffraction s'affinent, l'échange anionique est structuralement sélectif, il affecte principalement la fraction du solide la moins bien ordonnée laissant la phase de haute cristallinité non perturbée. Les résultats sont similaires à ceux de l'adsorption. On en déduit donc qu'un précurseur HDL de faible cristallinité devrait favoriser un taux d'échange plus élevé.

**Tableau 1 : Paramètres de maille de la phase [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] précurseur**

matrice	Groupe d'espace	a (nm)	c (nm)	d (nm)
[Zn <sub>3</sub> -Al-Cl]	R-3m	0,306	2,36	0,787
[Zn <sub>3</sub> -Al-Cl]- Uréase ech.	R-3m	0,308	2,31	0,777

Contrairement à la phase préparée par échange, les deux autres matrices présentent des modifications structurales significatives.

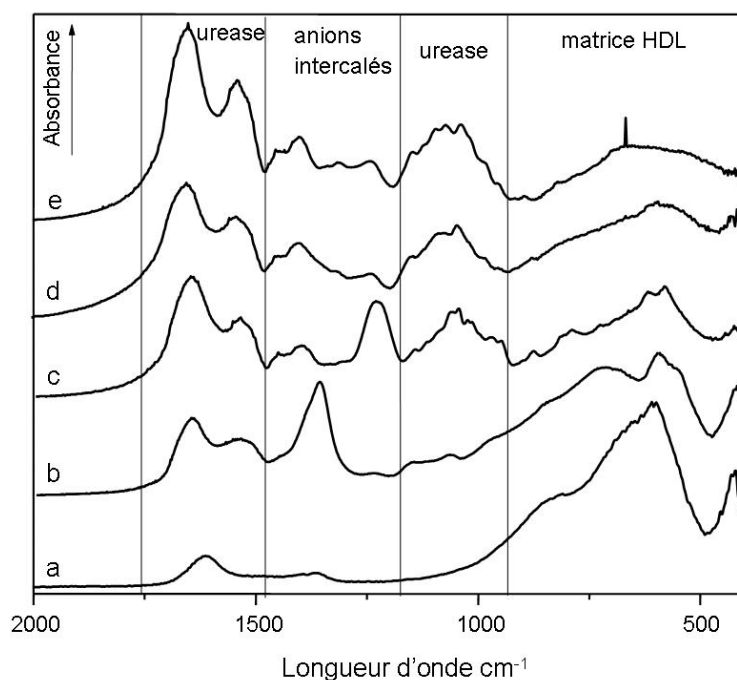
Pour le procédé de délamination/reconstruction, le diffractogramme montre une contraction de la distance interlamellaire passant de 25,2 Å (caractéristique d'une phase [Zn<sub>3</sub>-Al-DDS]) à 16,34 Å. Cette phase n'est pas le résultat d'une modification structurale due à l'enzyme. Elle correspond à une phase secondaire souvent mise en évidence au cours de ce procédé de synthèse comme l'ont montré Adachi-Pagano et coll<sup>13</sup>. Au cours du traitement thermique de la phase HDL [Zn<sub>3</sub>-Al-DDS] dans le butanol une fraction majoritaire se disperse en solution colloïdale alors que la fraction minoritaire la plus cristallisée subit une contraction de l'espace interlamellaire, favorisée par l'apparition d'une structuration plus compacte des domaines interlamellaires (haut degré d'interdigitation des anions DDS ou orientation des anions intercalés à 57° par rapport à c) et un renforcement des interactions de van der Waals des chaînes alkyle. La perte de cristallinité globale, mise en évidence sur le diffractogramme X, suggère la formation d'un composé amorphe lié à l'association matrice HDL/Urée.

Le procédé de coprécipitation conduit aux phases hybrides les moins structurées, avec une diminution d'intensité et un élargissement des raies (00l) appréciables ( $\Delta\theta = 2,12$ ). La préservation des raies (012) et (110) caractéristiques du feuillet HDL est constatée et confirme la formation de la phase HDL malgré l'influence importante de l'uréase sur la structuration de ces composés. En effet, la présence de biomolécules entraîne une forte modification de l'ordre d'empilement des feuillets. Par ailleurs, la position angulaire des raies (00l) suggère la présence de chlorures ou de carbonates dans les domaines interlamellaires. Comme pour les autres procédés de synthèse, l'enzyme n'est pas insérée de manière ordonnée entre les feuillets HDL.

### III.2.1.2 Spectroscopie infrarouge

Les spectres infrarouge des différentes matrices obtenues sont représentés sur la Figure 5. Ils coïncident avec la superposition des spectres de l'uréase et de la matrice [Zn<sub>3</sub>-Al-X]. Ces résultats montrent la formation d'une phase hybride uréase/HDL quel que soit le mode d'association de ces deux partenaires.

<sup>13</sup> F. Leroux, M. Adachi-Pagano, M. Intissar, S. Chauvière, C. Forano, J.P. Besse, J. Materials Chemistry, 11, 2001, 105-112



**Figure 5 : Spectres infrarouges : a) [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl], [Zn<sub>3</sub>-Al]-Uréase préparée b) par échange anionique, c) par délamination/reconstruction, d) par coprécipitation et e) uréase**

Pour toutes les phases préparées, nous observons les bandes de vibrations C=O (amide I) à 1653 cm<sup>-1</sup> et de déformation NH (amide II) à 1549 cm<sup>-1</sup> de l'enzyme, et les bandes de vibrations du réseau HDL (O-M-O à 427 cm<sup>-1</sup> et M-O entre 841 et 647 cm<sup>-1</sup>). Toutefois certains changements sont observés, particulièrement concernant les modes de vibration de l'anion intercalé. La bande à 1360 cm<sup>-1</sup> caractéristique des groupements CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> confirme la carbonatation de la phase HDL/uréase préparée par échange. Dans le cas du procédé de délamination/reconstruction, la bande intense à 1236 cm<sup>-1</sup> caractéristique de la liaison O-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> confirme la présence de DDS entre les feuillets. Par contre, pour la phase coprécipitée, aucune bande de vibration d'anions n'est observée suggérant que les anions Cl<sup>-</sup> issus des sels métalliques viennent compenser la charge positive des feuillets simultanément avec l'uréase.

Les intensités des bandes attribuées à la biomolécule sont plus intenses pour les matériaux hybrides préparés par coprécipitation ou délamination-réempilement suggérant que la quantité d'uréase immobilisée par ces modes de synthèse est plus importante. En effet, pour ces deux procédés, la surface d'échange de la matrice HDL avec l'enzyme est beaucoup plus importante car par coprécipitation le solide se construit à la surface de l'enzyme et par délamination, l'empilement des feuillets exfoliés piège l'enzyme. Dans le cas de l'échange, l'insertion est défavorisée à la fois par la taille trop importante de la biomolécule et par la stabilité des phases HDL chlorures ou carbonates. Le taux d'immobilisation d'uréase a été déterminée par spectroscopie UV-visible (275 nm). La masse d'enzyme immobilisée est calculée par

soustraction de la masse d'enzyme libre en solution à la masse initiale. Pour un rapport initial  $Q=1$ , environ 20 % d'uréase est immobilisé par échange pour 100% par coprécipitation. La quantité d'uréase non immobilisée par le procédé délamination-reconstruction n'a pas été mesurée. Il était difficile d'extraire la phase aqueuse de la phase alcoolique. En outre, il est possible qu'une partie de l'uréase ait été transférée dans le solvant alcoolique et soit dénaturée empêchant la détermination de sa concentration par spectroscopie UV.

### *III.2.2 Etude morphologique par microscopie électronique à balayage*

Les différents clichés de microscopie électronique à balayage de la matrice de référence [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] coprécipitée et des différentes phases hybrides sont représentés sur la Figure 7

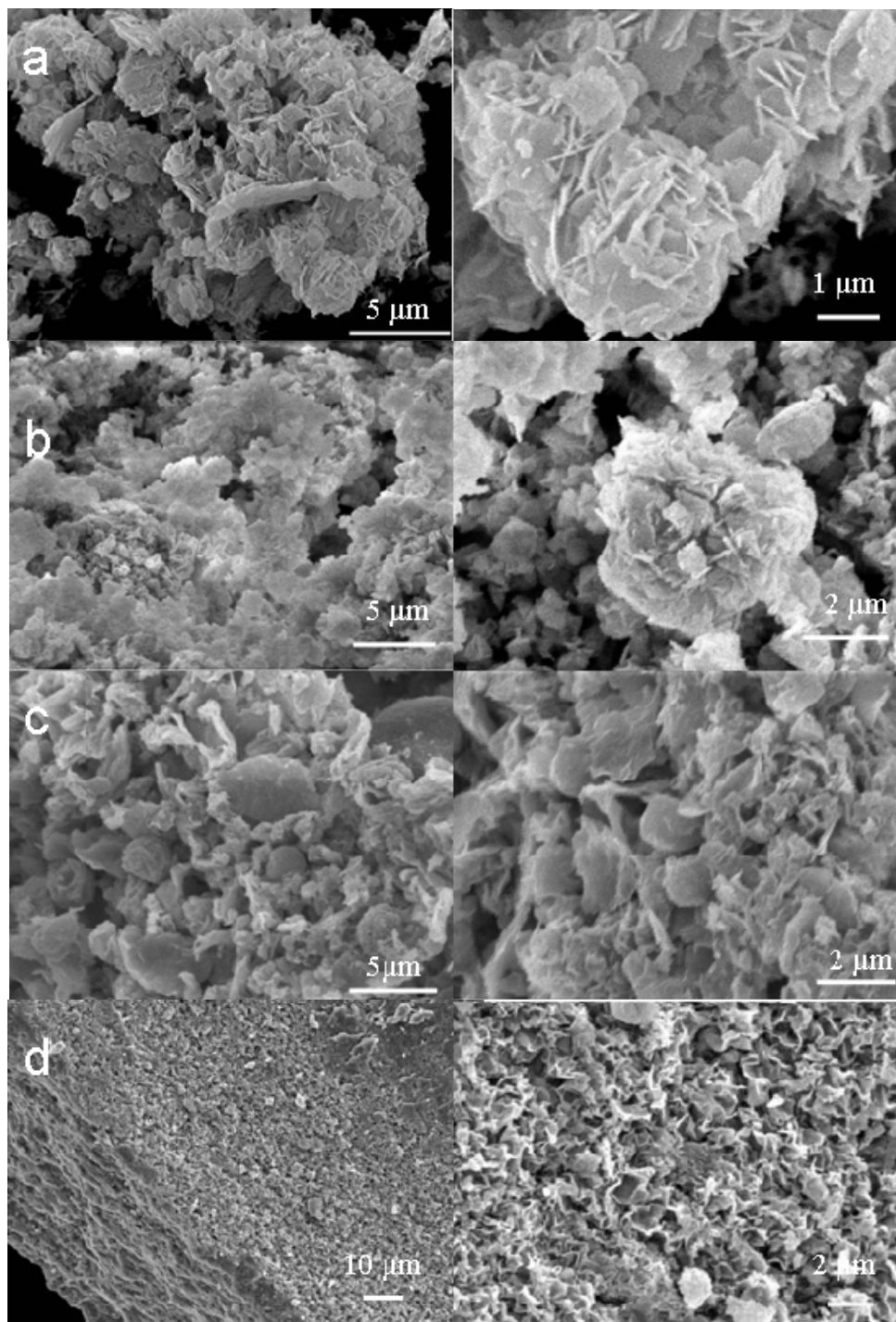
En général, les phases [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] coprécipitées présentent une morphologie homogène constituée de particules primaires de forme pseudo-hexagonale agrégées en « rose des sables » où les plaquettes individuelles de tailles comprises entre 500 et 800 nm sont relativement bien identifiées.

Les clichés MEB réalisés sur les matériaux hybrides affichent certaines modifications texturales.

La phase préparée par échange présente un aspect morphologique peu différent du précurseur mais une apparence plus fondue. L'adsorption de l'uréase sur la surface externe des particules secondaires conduit à la désagrégation des petites cristallites de surface et à une réorientation des plaquettes modifiées par l'uréase.

La méthode de délamination affecte l'agrégation des plaquettes en particules secondaires. On perd l'association en rose des sables au profit d'une agrégation en plaquettes empilées. Les particules primaires ne sont plus identifiées. La présence de molécules organiques (dodécylsulfate et enzyme) modifie la rigidité des plaquettes, leur confère une meilleure flexibilité et entraîne un repliement des bords.





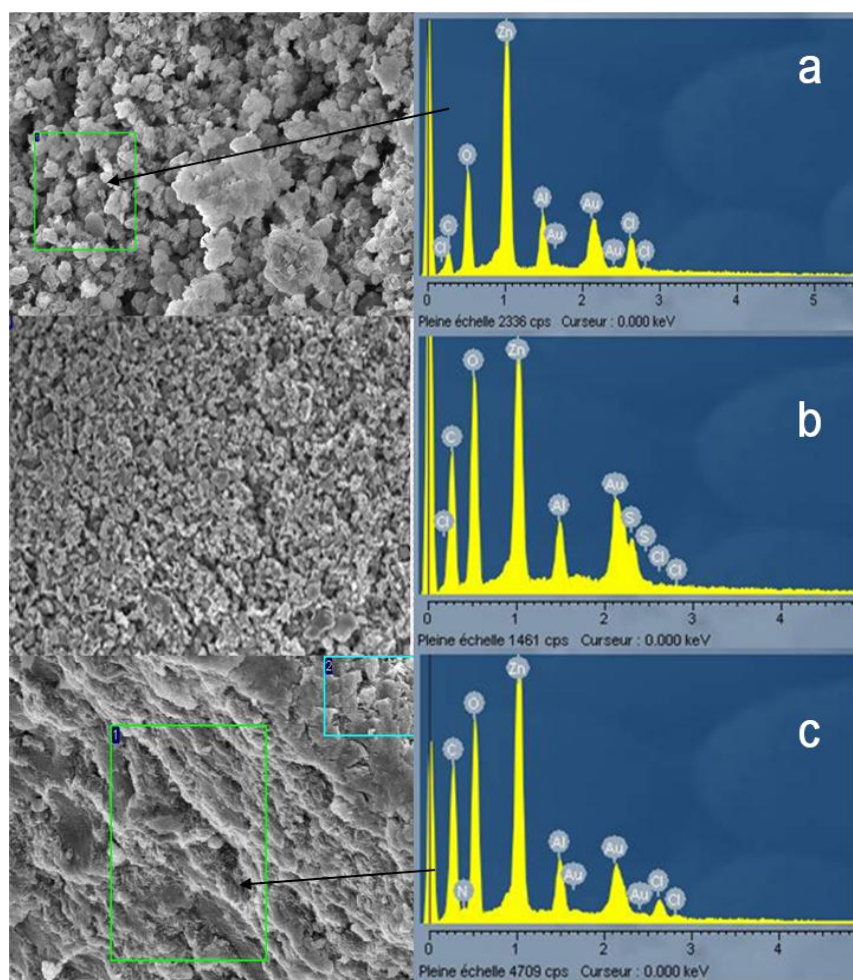
**Figure 6 : Clichés MEB a) précurseur, b) phase échangée, c) phase délamérée/reconstruite, d) phase coprécipitée**

Les clichés obtenus pour la phase hybride coprécipitée sont focalisés sur la face et sur la tranche d'un agrégat. Ces images révèlent une très forte orientation préférentielle des cristallites. Le cliché de la tranche de la particule montre clairement l'agencement des plaquettes empilées toutes parallèles. L'observation de la face de l'agrégat montre quant à elle un arrangement de particules ondulées en château de cartes. Les plaquettes s'accolent par leurs

côtés latéraux, délimitant une porosité élevée. Les épaisseurs des particules sont comprises entre 50 nm et 100 nm.

La présence des biomolécules dans le milieu de synthèse joue un rôle texturant directeur lors de la précipitation des hydroxydes doubles lamellaires puisque la phase obtenue perd son aspect textural bien défini et homogène au profit d'une agrégation dense des plaquettes orientées.

L'analyse des éléments par la technique EDX a été réalisée sur les échantillons lors des analyses microscopiques (Figure 9).



**Figure 7 : Clichés MEB avec couplage EDX pour les phases hybrides préparées par a) échange, b) délamination/reconstruction, c) coprécipitation**

Pour toutes les phases, les éléments constitutifs du feuillet (zinc, aluminium et oxygène) sont identifiés. Ces analyses qualitatives nous apportent des renseignements utiles.

Les rapports des pics Zn/Al sont pratiquement les mêmes pour les 3 échantillons, ce qui confirme le maintien ou la formation de phases mixtes [Zn-Al]. Les résultats d'analyse confirment la présence d'anions Cl<sup>-</sup> pour les phases échangées, de soufre provenant des anions

DDS pour les phases délaminiées, d'anions Cl<sup>-</sup> pour les phases coprécipitées ainsi qu'un taux de carbone élevé en fonction du taux d'immobilisation d'uréase. Le confinement de l'uréase dans les phases HDL ne permet jamais de contrebalancer toutes les charges positives des feuillets, la co-intercalation d'anions est donc nécessaire ; la répartition des espèces anioniques en surface ou entre les feuillets dépend de leur taille.

### ***III.3 Etude approfondie de la coprécipitation des phases [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl]-Urease***

Lors de l'étude comparée des méthodes de préparation des phases hybrides [Zn<sub>3</sub>-Al]-Uréase, la méthode de coprécipitation a permis d'obtenir un taux d'immobilisation d'uréase plus élevé que les autres protocoles. L'analyse des propriétés structurales et morphologiques révèle une forte dispersion des biomolécules dans la matrice HDL. Nous avons essayé d'optimiser cette méthode pour la préparation de matériaux hybrides [Zn<sub>R</sub>-Al]-Uréase avec R = 2,0 ; 3,0 et 4,0 en évaluant l'effet du pH (7, 7.5, 8, 9) et du rapport Q=Uréase/[Zn<sub>R</sub>-Al] (1/3, 1/2, 1, 3).

*Protocole expérimental* : Pour chaque synthèse, nous avons analysé le taux d'immobilisation d'uréase mesuré en pourcentage du taux attendu. En absence d'uréase, la méthode de synthèse permet d'obtenir un rendement massique moyen d'environ 84%. Le procédé élaboré consiste à préparer 50 mg de [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl]. Pour la phase de référence [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl], les analyses chimiques ont révélé une bonne conservation des rapports massiques Zn/Al et Cl/Al (Tableau 3). Pour préparer le matériau hybride, différentes masses d'uréase ont été mises en solution afin d'obtenir des rapports Q allant de 1/3 à 3. La détermination de l'uréase immobilisée a été déterminée par différence de l'uréase initiale et de la concentration d'uréase dans le surnageant. La solution récupérée après séparation des deux phases a été analysée par spectroscopie UV-Visible à 275 nm. L'enzyme n'a été détectée que dans le surnageant après centrifugation. L'analyse des eaux de lavage n'a pas montré la présence d'uréase.

#### ***III.3.1 Résultats expérimentaux***

Le Tableau 2 récapitule les rendements et les rapports uréase/HDL déterminés en fin de synthèse. La colonne nommée % synthèse correspond aux rendements du produit final. La colonne % uréase correspond à la quantité retenue par le matériau par rapport à la quantité initialement introduite. En connaissant la masse du produit hybride (HDL + Uréase) et la masse d'enzyme contenue dans ce matériau, nous pouvons déterminer la masse d'HDL précipitée. La

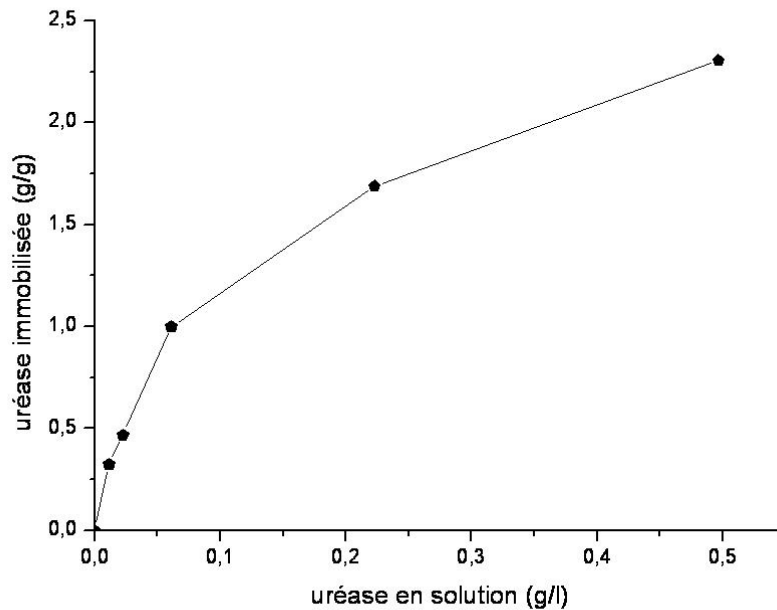
colonne % HDL correspond à la quantité d'HDL réellement précipitée par rapport à la masse attendue ( 50 mg).

**Tableau 2 : Rendements déterminés pour le matériau hybrides puis pour l'uréase et la matrice inorganique séparément ainsi que le rapport Q**

phase	Q initial	%synthèse	% urease	% HDL	Q moyen
R = 3 pH=8	1/3	94	90	94	0,325
	1/2	90	91	89	0,51
	1	90	90	91	0.99
	2	85	83	98	1.68
	3	80	76	90	2.5
R = 3 pH=7	1	78	91	65	1.4
R = 3 pH=8	1	90	90	91	0.99
R = 3 pH=9	1	89	90	87	1.03
R=2 pH=7,5	1	83	91	75	1,22
R = 3 pH=8	1	90	90	91	0.99
R=4 pH=9	1	93	91	95	0,95

Pour la série d'échantillons obtenus dans les conditions R=3 et un pH de consigne de 8, le rendement de précipitation de la matrice HDL ne varie pas avec l'augmentation de la concentration en uréase. La protéine n'affecte pas la formation de la phase minérale. Par contre, la quantité d'uréase immobilisée diminue quand le rapport Uréase/HDL, Q, augmente. La variation de la quantité d'enzyme immobilisée en fonction de la concentration d'enzyme en solution est présentée sur la Figure 8. La courbe obtenue s'apparente à un isotherme d'adsorption de type L, mettant en évidence deux étapes d'immobilisation, augmentation linéaire de l'immobilisation d'enzyme jusqu'à un rapport Q = 1.0, au-delà on observe un amortissement du à la saturation de la surface du matériau. Aux faibles concentrations en uréase les sites d'interactions HDL/Enzyme sont indépendants, l'interaction HDL/Enzyme

domine, aux concentrations supérieures l'agrégation enzyme/enzyme diminue la quantité confinée.



**Figure 8 : Représentation de la quantité d'uréase adsorbée en fonction de la concentration d'enzyme en solution**

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'influence du pH de précipitation. En diminuant la valeur de ce paramètre, le rendement massique de synthèse diminue. Une faible valeur du pH limite la précipitation de la phase HDL et provoque une diminution de la quantité de solide précipité. Les analyses chimiques corroborent ce résultat (Tableau 3). Effectivement le rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+}$  obtenu pour le matériau synthétisé à pH 8 ou 9 approche de la valeur théorique (3) alors que celui déterminé à pH 7 est largement inférieur (2,33 pour  $Q=1/3$ ). Ce dernier résultat suggère que le zinc n'a pas totalement réagi à  $pH = 7$ . En outre, on peut constater que quel que soit le pH utilisé, la quantité d'uréase confinée est presque identique. Ce comportement implique une élévation de la quantité d'uréase immobilisée. Pour un domaine de pH entre 8 et 9, le rapport  $Q$  est préservé.

Ce même résultat a été obtenu lors de la synthèse de phase présentant des rapports  $Zn^{2+}/Al^{3+}$  différents. En fonction de  $R$ , le pH de consigne est modifié ( $pH = 7,5$  pour  $R=2$ , 8 pour  $R=3$  et 9 pour  $R=4$ ). En augmentant la valeur du pH, la précipitation de l'HDL est favorisée. Par contre la quantité d'uréase immobilisée est la même. Pour des valeurs de pH 8 et 9, le rapport uréase/HDL est conservé contrairement au rapport obtenu à pH 7,5 qui, quant à lui, augmente. Cependant dans ces conditions de synthèse, les rapports  $Zn^{2+}/Al^{3+}$  sont proches de la valeur initiale des sels métalliques.

**Tableau 3 : Analyses chimiques des différents produits obtenus**

Q	pH	Zn/Al théo	Zn/Al	% C <sub>org</sub>	C <sub>org</sub> /Al	Cl/Al	(CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )/Al	(ΣA <sup>-</sup> )/Al	Taux d'échange d'uréase
0	8	3	2,99		0	0,99	-	0,99	0
1/3	8	3	2,87	11	5,09	0,65	0,04	0,73	0.27
1	8	3	3,23	19,72	13,5	0,48	0,07	0,62	0.38
3	8	3	2,84	31,96	39,75	-	0,12	0,24	0.76
1/3	7	3	2,33		-	0,51	0,04	0,59	0.41
1/3	9	3	2,91	10,58	4,66	0,54	0,04	0,62	0.38
1/3	7,5	2	1,91	11	3,56	0,59	0,03	0,65	0.35
1/3	9	4	4	12,17	6,98	0,47	0,05	0,57	0.43

Les analyses chimiques révèlent la présence d'anions Cl<sup>-</sup> et CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, la compensation de charge de la structure hôte ne peut pas être assurée uniquement par l'immobilisation d'enzyme. La contamination par les carbonates reste relativement faible. Le taux d'échange d'uréase augmente logiquement avec le rapport Q.

Le relargage de l'enzyme immobilisée a été évalué sur une phase [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl]-uréase (Q = 1) dans l'eau ou dans une solution tampon phosphate à différentes concentrations 10, 50 et 100 mM. Le protocole consiste à mettre en suspension le matériau. Le milieu réactionnel est ensuite agité pendant 24 h sous atmosphère inerte. Le solide est récupéré par centrifugation. Afin de déterminer la concentration d'uréase, le surnageant est analysé par spectroscopie UV à 275 nm. La remise en suspension dans une solution d'eau décarbonatée entraîne un relargage d'environ 5 % d'enzyme immobilisée suggérant que seules les molécules faiblement liées avec la matrice sont déplacées. Par contre, 50 % de la quantité d'enzyme immobilisée est libérée dans la solution tampon, quelle que soit la concentration utilisée. Le mécanisme de relargage se fait donc par échange anionique, l'affinité de la matrice HDL étant plus grande pour les ions phosphates que pour l'uréase. Ce relargage indique par ailleurs que 50% de l'uréase peut diffuser facilement dans la matrice qui présente une faible cohésion structurale.

### III.3.2 Etude structurale

#### III.3.2.1 Diffraction des rayons X

Les diffractogrammes des rayons X des phases hybrides [Zn-Al-Urease] sont comparés au diffractogramme d'une phase de référence [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl], (Figure 9), dont les paramètres de maille affinés (groupe d'espace : R-3m) sont *a* = 3,08 Å et *c* = 23,39 Å (*d* = *c*/3) et la distance interlamellaire *d* = 7,80 Å typique de la phase chlorure.

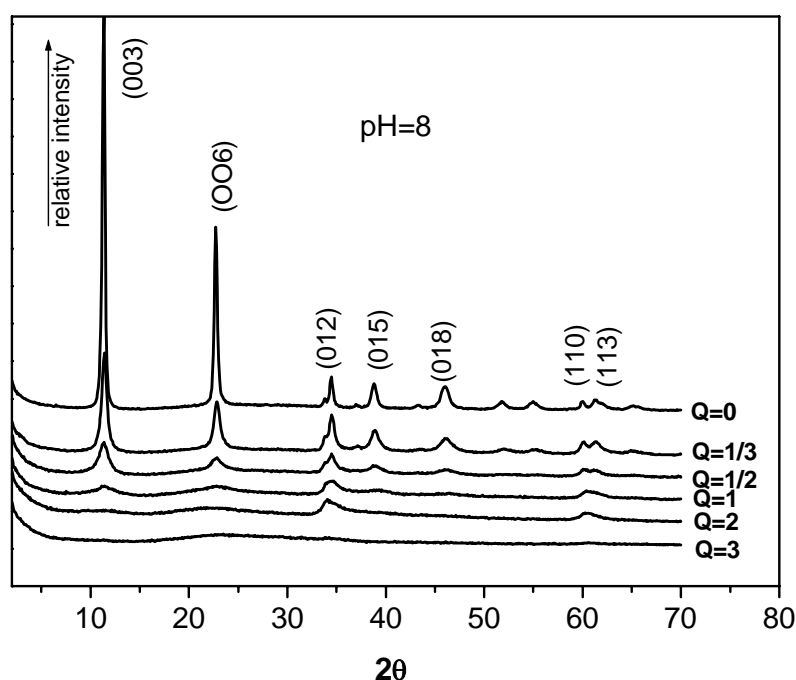


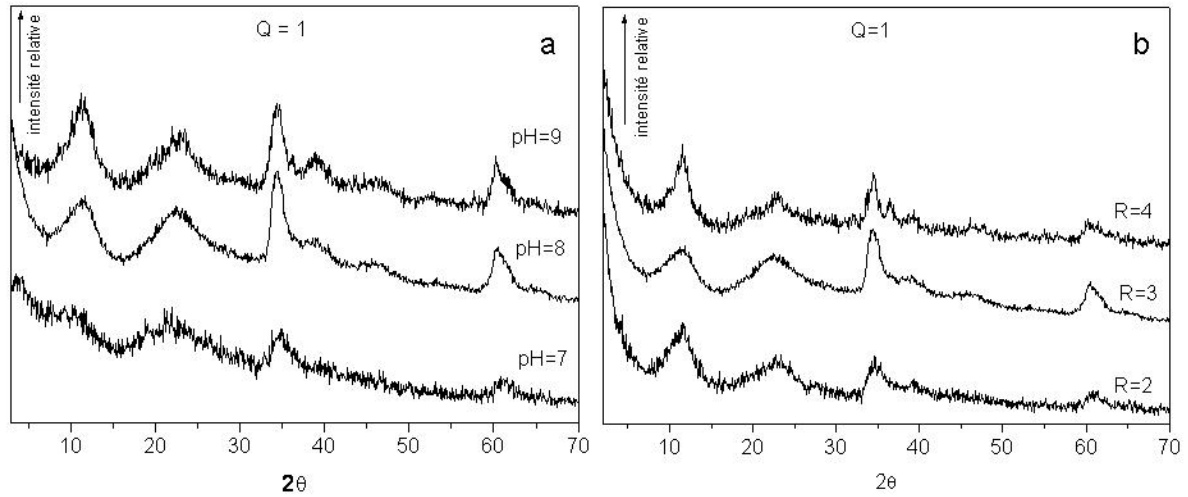
Figure 9 : Diffractogrammes X des phases [Zn<sub>3</sub>Al-Cl]-uréase avec l'évolution du rapport Q

Les phases hybrides contenant l'uréase montrent une forte diminution de la cristallinité. Le nombre de raies de diffraction est plus faible comparé à la phase de référence. Leur élargissement montre un désordre plus important de la structure avec un net effet turbostratique. Ces diffractogrammes X sont caractéristiques de phases hautement désordonnées contenant des anions chlorures ou carbonates.

La préservation des raies de diffraction (012) et (110), excepté pour la phase Q=3, met en évidence la formation effective des feuillettes HDL. Ces observations structurales montrent la possibilité de précipiter la phase [Zn-Al-Cl] dans un réseau bioorganique qui oriente, cependant, la cristallinité de cette phase inorganique.

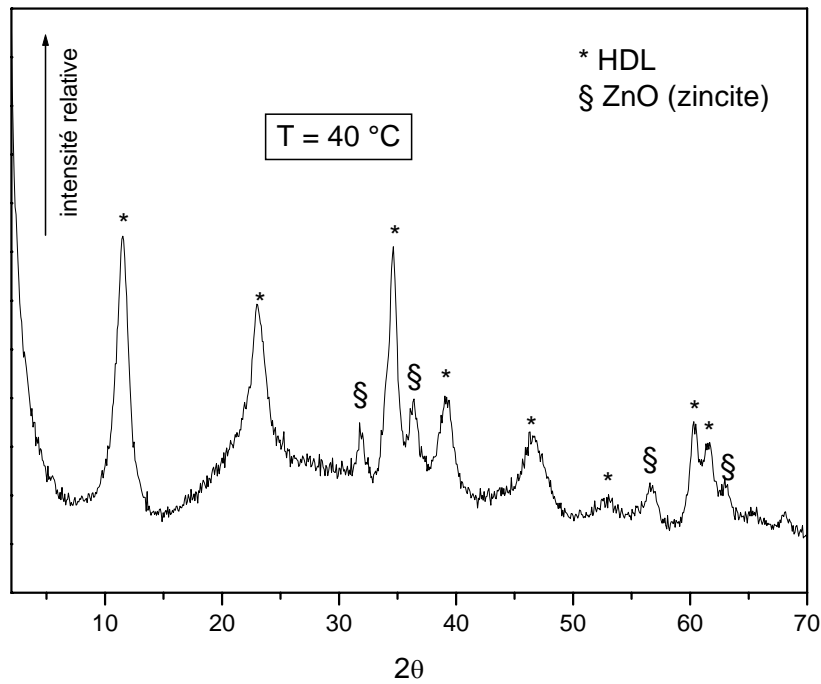
Lorsque le rapport uréase/HDL (Q) évolue entre 1/3 et 3, l'intensité des raies de diffraction diminue fortement, ce qui s'explique par une perte de l'ordre d'empilement des feuillettes. La taille volumineuse de l'uréase (monomère : 9.6 nm x 5.4 nm) et la haute affinité de l'enzyme pour le matériau inorganique s'oppose à la croissance cristalline d'HDL selon la direction *c* ainsi qu'à l'organisation de la structure lamellaire du composé.

On montre par ailleurs que l'effet destructurant subi par l'HDL peut-être limité par une augmentation du pH de coprécipitation ou du rapport Zn/Al (Figure 10).



**Figure 10 : Diffractogrammes X des phases synthétisées pour Q =1 a) à différents pH ou b) rapport R**

Il est possible de souligner l'influence de la température sur la précipitation du matériau hybride. L'étude a été réalisée dans les conditions suivantes : Q=1/2, pH = 8, T = 40°C. Cette température correspond à la température optimale à laquelle l'activité enzymatique de l'uréase est maximale. Le diffractogramme X montre la formation d'une phase parasite caractérisée comme de l'oxyde de zinc ZnO de type zincite (Figure 11).



**Figure 11 : Diffractogramme de la phase synthétisée à 40°C**



### III.3.2.2 Etude par absorption des rayons X

Une étude sur l'environnement local autour des atomes de zinc a été réalisée par spectroscopie d'absorption X au seuil K du Zn. Les conditions opératoires ainsi que les procédures d'affinement des données EXAFS sont décrites dans l'annexe 3.

Les modules des transformées de Fourier représentés sur les Figures 13 et 14, ont été déterminés pour les échantillons suivants :

- [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] à pH =8 et Q compris entre 1/5 et 3
- [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] à pH =7 et Q = 1/3
- [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl] à pH =7,5 et Q = 1/3

Généralement, les courbes de pseudo-distributions radiales autour de l'atome de zinc pour les phases [Zn-Al-Cl] révèlent plusieurs contributions dont quatre sont clairement identifiées. Il s'agit pour la première contribution, notée P<sub>1</sub>, des atomes d'oxygène autour du zinc en environnement octaédrique. Les trois autres contributions sont liées aux voisins métalliques du zinc, noté Zn-Me avec Me correspondant aux atomes de zinc et d'aluminium. Les contributions P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub> correspondent aux distances  $a$ ,  $a\sqrt{3}$  et  $2a$ , respectivement, de l'atome de zinc avec les différentes sphères de coordination des atomes métalliques (Figure 12). L'amplitude plus élevée de la contribution P<sub>4</sub> comparée à celle de P<sub>3</sub> est très souvent caractéristique de phases lamellaires et dans le modèle structural idéal de la phase HDL, ceci correspond à 6 atomes Zn<sup>2+</sup> à une distance  $2a$  révélant que les atomes métalliques Zn-Zn-Zn au sein du feuillet sont bien alignés. Cet effet est appelé « focussing effect ».

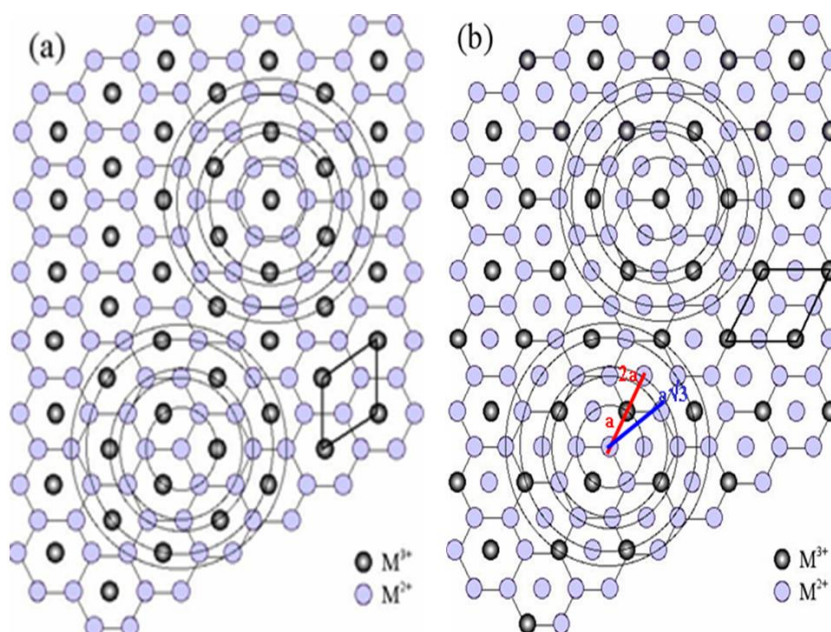
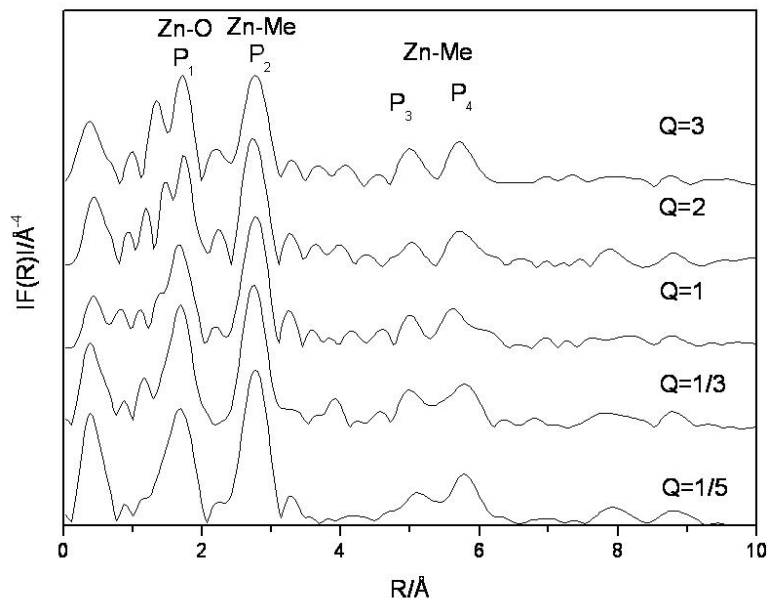


Figure 12 : ordre local idéal pour une phase a) M<sup>II</sup>/M<sup>III</sup>=2 et b) M<sup>II</sup>/M<sup>III</sup>=3

Pour la première série d'échantillons dont le rapport uréase/HDL évolue, l'identification des quatre contributions confirme la précipitation de phases de type HDL. Cependant, la présence de l'enzyme implique certaines modifications structurales.



**Figure 13 : Modules des transformées de Fourier au seuil K du Zn.**  
Les distances ne sont pas corrigées du déphasage atomique

Les maxima de la contribution  $P_1$  pour les matériaux ayant un faible rapport uréase/HDL ( $Q < 1$ ) se situent à la même distance mais présentent des intensités différentes. Cette observation suggère que l'atome de zinc se trouve au centre d'un octaèdre dont les sommets sont des atomes d'oxygène, mais ayant une répartition différente autour de l'atome central. En outre, un faible déplacement vers des distances plus longues pour les matériaux  $Q > 1$  impliquerait une légère déformation de l'octaèdre liée à une diminution de la cristallinité de ces phases.

La contribution  $P_2$ , quant à elle, diminue d'intensité avec l'augmentation de la concentration d'enzyme. Ce changement semble indiquer la présence d'une phase amorphe supplémentaire et/ou une amorphisation progressive de l'HDL ou bien encore un changement du rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+}$ . En effet, dans le cas du modèle structural idéal d'une phase  $R=3$ ,  $P_2$  est associée à 4 Zn-Zn et 2 Zn-Al. Une diminution du rapport Zn/Al de 3 à 2 serait accompagnée d'un changement de l'ordre cristallin attendu pour  $P_2$  devenant alors 3 Zn-Zn et 3 Zn-Al. Ceci aurait pour conséquence une diminution d'intensité puisque l'amplitude de rétrodiffusion de l'aluminium est plus faible que celle du zinc.

Si le feuillet est bien organisé, l'intensité de la contribution  $P_4$  est plus élevée comparée à la celle de la contribution  $P_3$ . En augmentant, la quantité d'uréase lors de la préparation des matériaux, la différence d'amplitude entre ces deux pics s'atténue. Qualitativement,

l'observation des pics de corrélation à longues distances pourrait s'expliquer par une perte d'arrangement structural du feuillet ou par la présence d'une nouvelle distance Zn-Al d'un matériau non HDL. Ces distances Zn-Me seraient proches de celles observées pour P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub> décrites par le modèle structural idéal. La différence de l'environnement du zinc à longues distances est confirmée par le déplacement des contributions P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub>.

Par ailleurs, l'apparition d'un épaulement puis d'un dédoublement visible à des distances plus faibles du pic correspondant à la première contribution (P<sub>1</sub>) à partir de Q=1 soumet le passage du zinc d'un environnement octaédrique à un environnement tétraédrique. L'augmentation d'intensité ainsi que le déplacement de cette nouvelle contribution vers des distances plus courtes évoquent, tous deux, la formation d'une nouvelle phase de plus en plus structurée ayant une coordination tétraédrique d'atomes d'oxygène autour du zinc. L'étude par diffraction des rayons X pour une phase préparée à 40°C dans un rapport uréase/HDL de 1/2 révèle la précipitation d'une phase parasite d'oxyde de zinc. Cependant, il est difficile de conclure sur la nature de ce composé à partir des diffractogrammes des rayons X puisque cette phase demeure amorphe.

La deuxième série d'échantillons concerne l'influence de paramètres tels que le pH de précipitation (7 ou 8) ou le rapport Zn/Al (ici R=2, pH= 7,5 et R=3, pH = 8). Cette série sera comparée à la phase de référence [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] avec Q=1/5 (Figure 14).

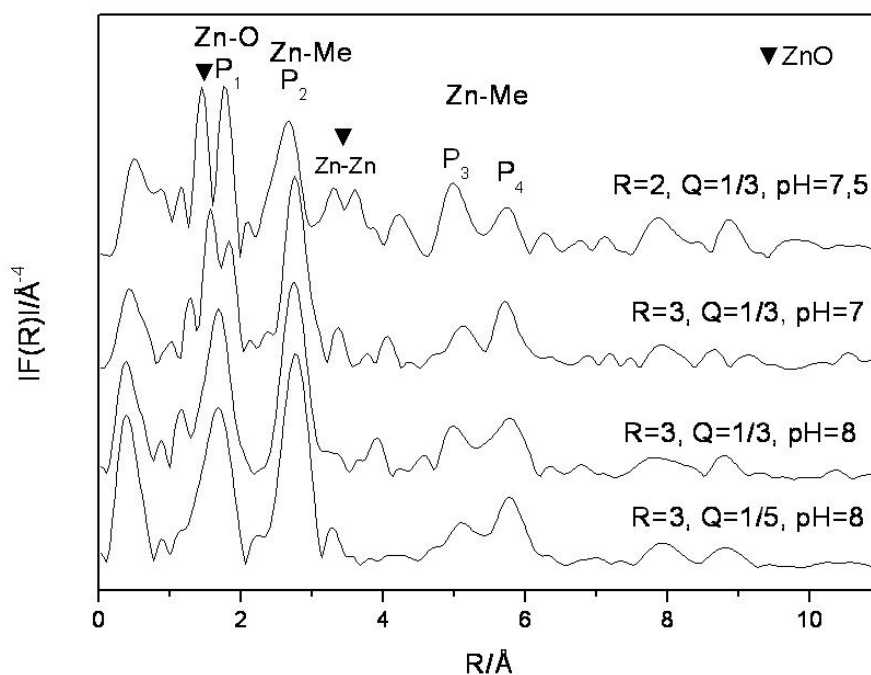
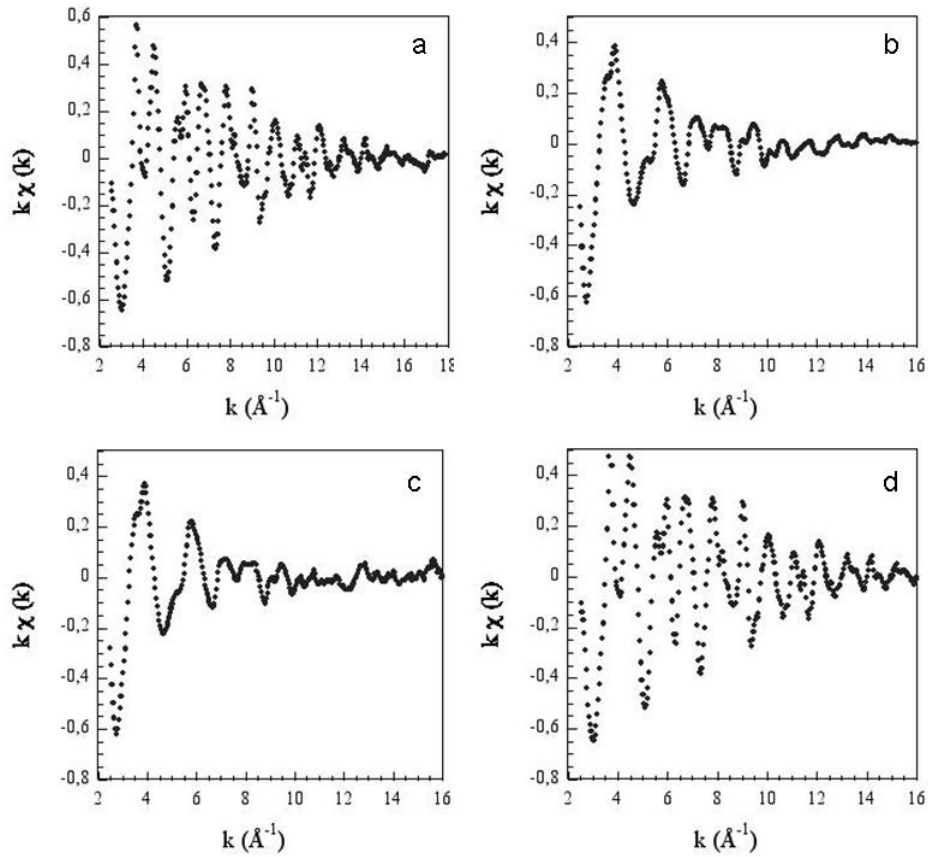


Figure 14 : Modules des transformées de Fourier au seuil K du Zn.  
Les distances ne sont pas corrigées du déphasage atomique

Dans le cas de la synthèse à pH = 7, on observe un dédoublement des pics P<sub>1</sub> indiquant que l'atome de zinc se trouve dans deux environnements distincts. La deuxième contribution, correspondant au premier contact métallique, se situe à la même distance, mais son amplitude diminue par rapport à la phase synthétisée à pH = 8. D'après les analyses chimiques, le rapport Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> est plus faible. Comme il a été cité précédemment, l'augmentation de liaisons Zn-Al, d'après les modèles structuraux idéaux, lorsque le rapport Zn/Al diminue, entraîne une diminution d'intensité. Ce changement structural local pourrait s'expliquer par le passage d'une phase [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] en deux phases ([Zn<sub>2</sub>-Al-Cl] + ZnO amorphe).

Dans les conditions expérimentales suivantes R=2, Q=1/3 et pH = 7,5, deux phases sont distinctement identifiées. Le dédoublement du pic P<sub>1</sub> et la forte diminution d'intensité du pic P<sub>2</sub> peuvent s'expliquer comme précédemment. Malgré les analyses chimiques qui montrent la conservation du rapport Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup>, la phase HDL présente sans doute un rapport R plus petit. L'excès de zinc semble avoir précipité sous forme de ZnO. En effet, pour cette phase, les contributions des liaisons Zn-O et Zn-Zn différentes d'une phase HDL sont discernées (Figure 14).

Pour confirmer ces hypothèses, un affinement des modules par extraction polynomiale caractérisant la structure fine des matériaux a été réalisé. Les spectres expérimentaux des modulations EXAFS correspondant aux échantillons ZnO, [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] avec Q = 1/5 et Q=3, et [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl] avec Q=1/3 sont représentés sur la Figure 15.



**Figure 15 :** Oscillations EXAFS au seuil K du zinc des composés a) ZnO, b) [Zn<sub>3</sub>-Al] Q = 1/5 , c) [Zn<sub>3</sub>-Al] Q = 3 d) [Zn<sub>2</sub>-Al] Q = 1/3

Les échantillons ZnO et [Zn<sub>3</sub>-Al] avec Q=1/5 servent de référence. Les battements et oscillations du signal  $k\chi(k)$  de la phase [Zn<sub>3</sub>-Al] avec Q=3 ressemblent à ceux de la phase de référence HDL indiquant qu'entre Q=1/5 à 3, les matériaux présentent la même structure fine. Par contre, la phase synthétisée dans un rapport  $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+} = 2$  à pH 7,5 tend vers la structure fine de la phase ZnO.

Les affinements de la première sphère de coordination autour du zinc pour les phases ZnO de référence ont été réalisés (Figure 16).

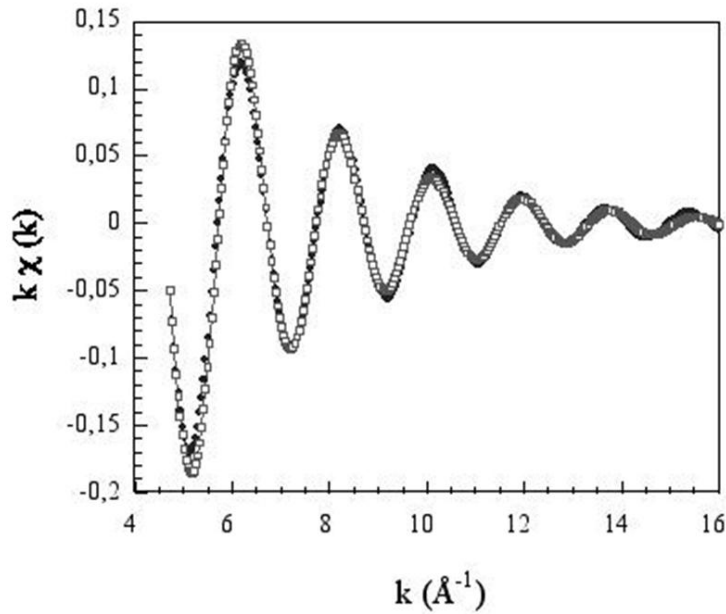


Figure 16 : Simulation de la première couche au seuil du zinc de ZnO

D'après les données cristallographiques (Tableau 4), il a été possible d'extraire le facteur d'échelle  $S_0^2$ , le libre parcours moyen  $\Gamma_{\text{Zn/O}}$ . Au cours des prochains affinements, ces deux paramètres seront bloqués.

L'affinement de la première et seconde sphère de coordination de Zn-O pour l'échantillon HDL de référence a été réalisée (Figure 17). Les résultats sont en bon accord avec ceux déjà obtenus pour une phase HDL<sup>13</sup>.

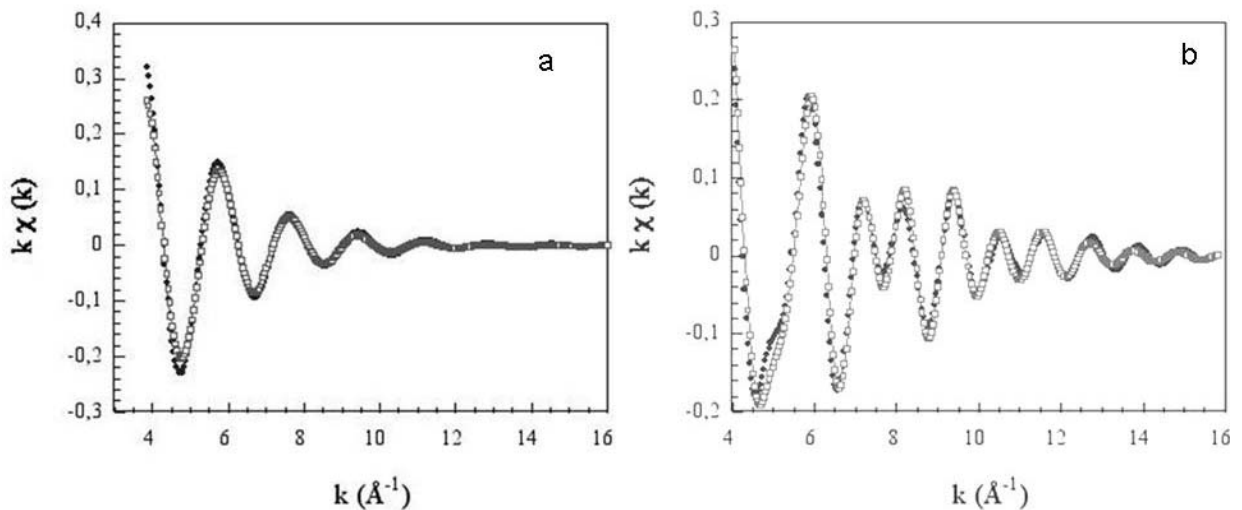
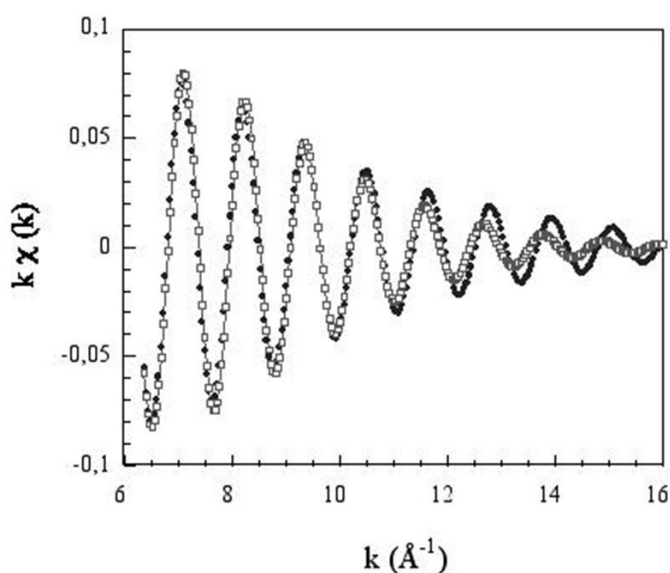


Figure 17 : Simulation a) de la première couche et b) des deux premières couches au seuil du zinc de [Zn<sub>3</sub>-Al] Q = 1/5

D'après les résultats des paramètres structuraux (Tableau 4), le nombre total de cations est supérieur à 6, mais reste dans la marge d'erreur communément admise pour l'affinement EXAFS (0,02 Å pour les distances et 15 à 20 % sur le nombre d'atome).

Les résultats (Tableau 4) issus de l'affinement EXAFS de la phase Q=3 (Figure 18) montrent au niveau de la deuxième sphère de coordination 4 distances Zn-Zn et 2 distances Zn-Al. D'après les modèles structuraux idéaux, le rapport Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> tend vers 3 confirmant les analyses chimiques. La diminution de l'intensité de la contribution P<sub>2</sub> semble appuyer les hypothèses d'une amorphisation de la phase HDL et de la présence d'une nouvelle phase amorphe. L'introduction d'une distance supplémentaire Zn-O à 1,99 (visible sur le modules de Fourier) améliore l'affinement de la sphère Zn-O. La présence de ZnO est visible mais celle-ci doit être sans doute minoritaire puisque l'ordre local au niveau des interactions Zn-Zn est absent.



**Figure 18 : Simulation de la première couche au seuil du zinc de [Zn<sub>3</sub>-Al] Q = 3**

Finalement, l'affinement de la première sphère de coordination de la phase [Zn<sub>2</sub>-Al] a été effectuée (Figure 19). Deux corrélations Zn-O ont été identifiées à 2,09 et 1,92 Å. Cette dernière distance proche de celle de la distance Zn-O présente dans l'oxyde de zinc confirme l'hypothèse de la formation de cette phase parasite.

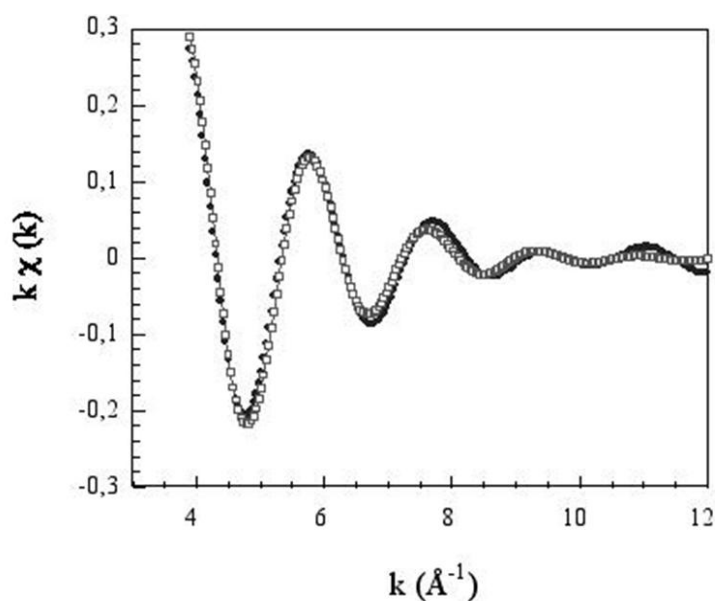


Figure 19 : Simulation de la première couche au seuil du zinc de [Zn<sub>2</sub>-Al] Q = 1/3

L'affinement est de moyenne qualité compte tenu de la petite région  $\Delta k$  concernée et n'est donné ici qu'à titre indicatif. Qualitativement, l'affinement des autres sphères de coordination révèle la présence de corrélation Zn - rétrodiffuseur lourd (Zn) à des distances incompatibles avec la structure HDL ce qui va dans le sens d'un mélange de phases.

Les résultats de l'affinement EXAFS sur les deux premières couches environnant le zinc sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Paramètres structuraux issus de l'affinement des paramètres EXAFS

	Corrélation	N	R(Å)	$\sigma^2 10^{-3} (\text{Å}^2)$
ZnO	Zn-O	3	1,975	5,82
		1	1,988	
[Zn <sub>3</sub> -Al] (Q=1/5)	Zn-O	6	2,09	9,6
	Zn-Zn	4,2	3,12	
	Zn-Al	4	3	
[Zn <sub>3</sub> -Al] (Q=3)	Zn-O	6	3,11	8,14
	Zn-Zn	4		
	Zn-Al	2	3,05	5,16
[Zn <sub>2</sub> -Al] (Q=1/3)	Zn-O	2	2,09	
			1,92	

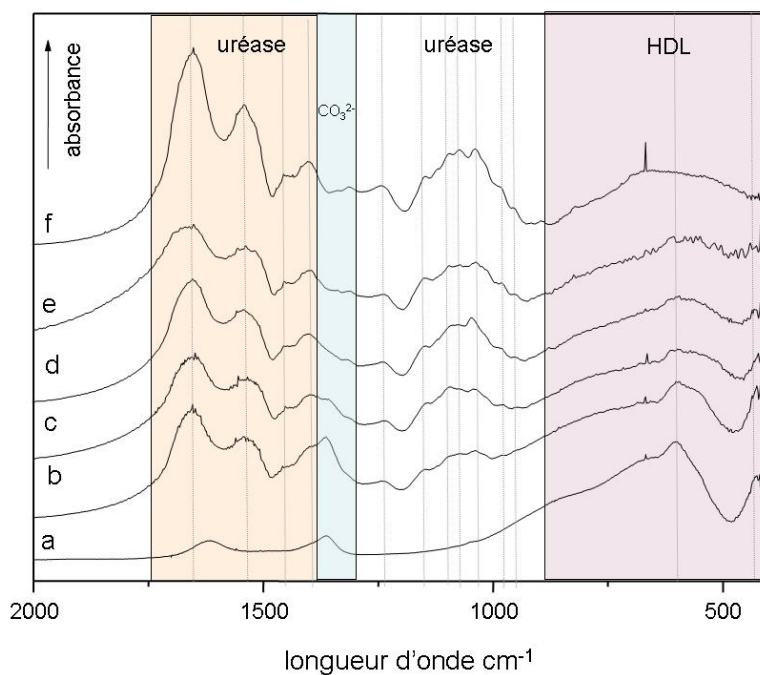


Les expériences étant réalisées sous azote liquide, la valeur du facteur Debye Waller n'est pas influencée par l'agitation thermique. Par conséquent, les valeurs élevées obtenues dépendent plus d'un désordre structural intrinsèque au sein des matériaux.

Alors que l'absorption des rayons X au seuil K du zinc révèle la présence d'une phase parasite, la diffraction des rayons X ne corrobore pas ce résultat. Deux hypothèses peuvent être présentées à savoir : la quantité de cette impureté est trop faible pour être détectée ou sa cristallinité est trop pauvre et peut être dissimulée par la présence de l'uréase et de la phase HDL.

### III.3.2.3 Spectroscopie infrarouge

La Figure 20 représente les spectres infrarouge des phases élaborées en fonction du rapport uréase/HDL. Ils correspondent à la superposition des bandes de vibration de l'uréase ainsi que de la phase [Zn-Al] confirmant que l'uréase est immobilisée. Les signatures infrarouge des enzymes libre et immobilisée sont identiques en nombres et positions des bandes. Les interactions enzymes/HDL ne modifient pas la conformation de la protéine. En outre, l'adsorption de l'enzyme sur la face externe du matériau inorganique est confirmée puisqu'aucun déplacement des bandes n'est observé.



**Figure 20 : Spectroscopie IR des phases hybrides avec Q =, a) 0, b) 1/3, c) 1/2, d) 1, e) 2 et f) de l'uréase.**

L'évolution de la quantité d'enzyme immobilisée lorsque Q augmente est démontrée par l'accroissement d'intensité des bandes de l'enzyme par rapport à la bande de référence du réseau HDL  $\delta_{O-M-O}$  à 424 cm<sup>-1</sup>.

Par ailleurs, la présence de la bande à 1360 cm<sup>-1</sup> caractéristique des carbonates intercalés est identifiée uniquement pour les phases à Q=1/5 et 1/3. Au delà, la carbonatation reste mineure.

Les spectres infrarouge des composés hybrides préparés dans d'autres conditions ne sont pas présentés car leur interprétation reste similaire.

La phase secondaire (ZnO) mise en évidence par absorption des rayons X n'est pas identifiée par spectroscopie infrarouge. Les bandes relatives à cette nouvelle phase peuvent être dissimulé par les bandes de la phase hydroxyde double lamellaire et de l'uréase.

#### III.3.2.4 Spectroscopie UV-visible

Les acides aminés, constituant les protéines, absorbent la lumière entre 200 et 400 nm (Figure 21). La spectroscopie UV permet donc d'identifier et de quantifier la présence d'enzyme en solution, voire dans un matériau solide. Précédemment, nous avons utilisé cette méthode pour mesurer la concentration de l'uréase dans le surnageant. En outre, la spectroscopie infrarouge a montré que l'enzyme immobilisée conservait sa conformation spatiale. Afin de corroborer ce résultat, le matériau hybride a été analysé par spectroscopie UV. Cette méthode permet de s'informer sur la conformation tridimensionnelle de l'enzyme confinée.

Les enzymes présentent plusieurs bandes d'absorption caractéristiques des acides aminés. La plupart des ces molécules organiques absorbent la lumière ultraviolette au voisinage de 190-210 nm (transitions électroniques  $\pi \rightarrow \pi^*$  des groupements amides). Ce domaine de longueur d'onde correspond aux liaisons peptidiques et est sensible à la conformation de la protéine. L'étude des spectres d'adsorption des différents acides aminés révèle que les trois acides aminés aromatiques (Trypsine, Phénylalanine, Tyrosine) ont un deuxième pic d'absorption à une longueur d'onde plus élevée : au voisinage de 280 nm, correspondant aux transitions électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$  des noyaux aromatiques<sup>14</sup>.

<sup>14</sup> D.J. Holme, H. Peck, Analytical Biochemistry, 3è éd., 1998

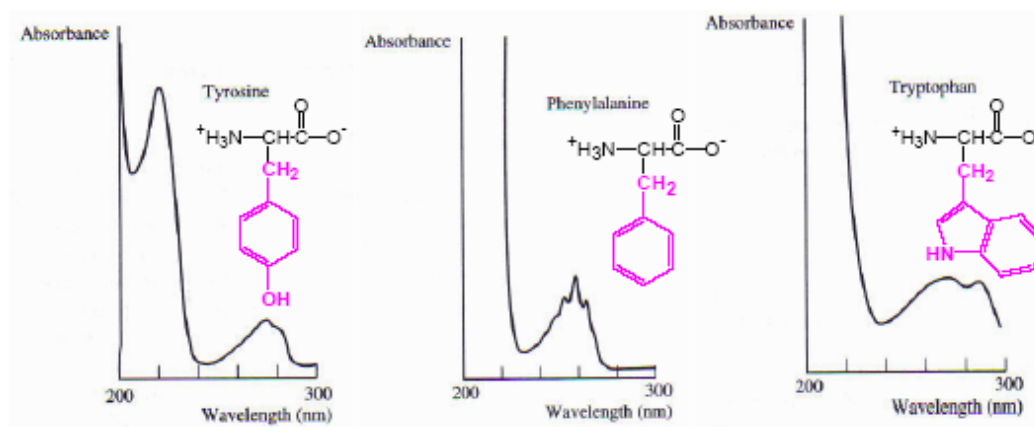


Figure 21 : Spectre UV de la tyrosine, phénylalanine et tryptophane<sup>14</sup>

L'étude a été réalisée par spectroscopie de réflexion diffuse UV-Visible sur le matériau hybride dans un domaine de longueurs d'onde compris entre 200 et 400 nm. 12 mg de solide ont été dispersés dans une solution de glycol pour faciliter la dispersion du solide puis déposés entre deux plaques de quartz.

La Figure 22 présente les spectres de l'urée solide (12 mg et 4,5 mg) et le spectre de l'urée en solution (0,3 mg/ml d'eau décarbonatée).

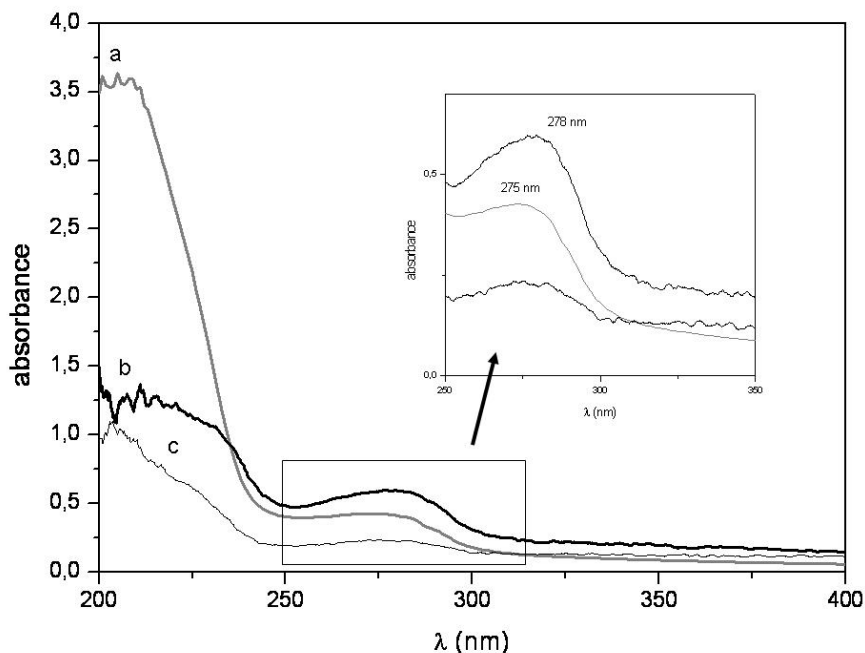
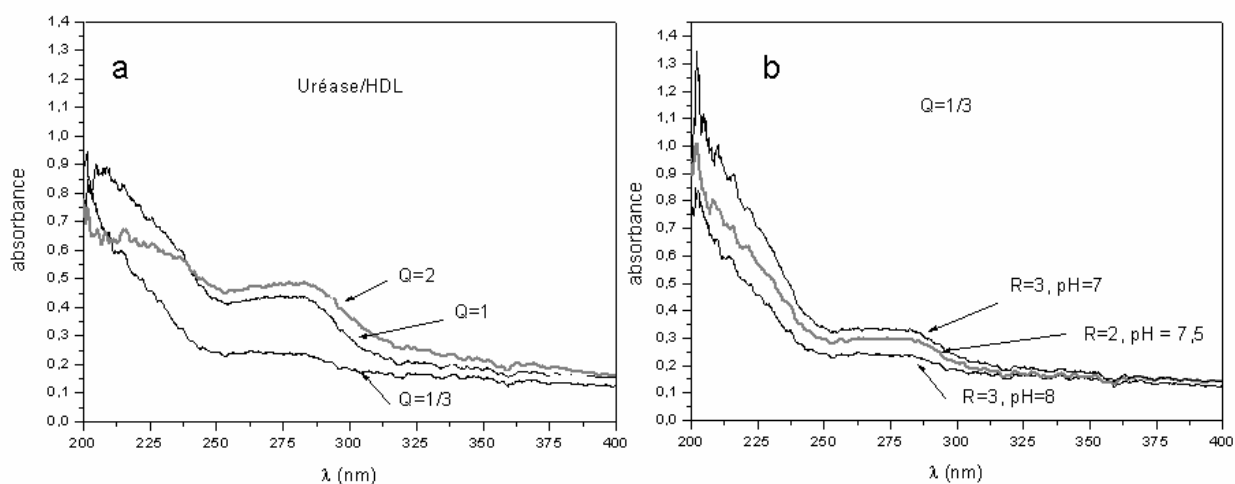


Figure 22 : Spectre UV a) de l'urée en solution et de b) 12 mg et c) 4,5 mg d'urée solide

L'allure générale des spectres d'adsorption de l'urée solide ou dissoute est presque similaire. Cependant, on note la diminution d'intensité de la bande d'absorption des amides pour les phases solides ainsi qu'un léger décalage du maximum d'absorption des aromatiques de 264

nm → 278 nm. Ces modifications sont entraînées par un changement de conformation de la structure 3D de l'uréase entre la phase solide et la phase liquide dans laquelle la protéine est totalement solvatée et subit un gonflement de sa structure. Il est à noter que les bandes d'absorbance entre 200 et 240 nm s'élargissent lorsque la quantité d'uréase augmente.

Les spectres UV-Visible ont été enregistrés pour les phases HDL préparées avec plusieurs rapports Enzyme/HDL, Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> et à divers pH. Tous les spectres réalisés confirment le confinement de l'uréase dans la matrice hôte (Figure 23). Dans la région 250 – 350 nm, l'allure des spectres est similaire au spectre de l'uréase libre. Nous pouvons observer toutefois un décalage la bande d'absorption des acides aminés aromatiques de  $\Delta\lambda = 2$  nm vers le rouge, c'est-à-dire à de plus faibles énergies. L'immobilisation de l'uréase dans des matrices HDL n'affecte pas les groupements aromatiques qui par leur propriété hydrophobe s'éloignent des surfaces des feuillet.



**Figure 23 : Spectres UV de l'uréase a) en fonction de Q et b) en fonction de R et du pH**

Pour  $Q \leq 1,0$ , l'augmentation de l'absorbance à 200 nm et à 280 nm évolue avec la quantité d'uréase confinée, la diminution du pH et du rapport Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> (R) (Figure 23.a). Cependant, au delà de ce rapport c'est à dire pour un excès d'uréase, on note une atténuation importante de ces deux bandes et plus particulièrement de la bande des fonctions amides à 220 nm. Alors que pour les faibles quantités d'uréase, les spectres sont proches de l'uréase libre (4,5 mg), à  $Q > 1,0$  on observe un profil d'absorption proche de l'uréase concentrée (12 mg). Il semble donc que pour ces taux de charge élevés, la surface du matériau soit totalement saturée par l'uréase qui forme alors des agrégats concentrés. Les spectres rendent compte alors des interactions dominantes uréase/uréase et non plus uréase/HDL.

La région des transitions électroniques des groupes amides ou liaisons peptidiques (200 – 250 nm) est fortement modifiée après immobilisation de l'uréase dans les matrices HDL. On note une chute d'intensité par rapport à la bande à 280 nm, avec le déplacement du maximum d'adsorption vers les petites longueurs d'onde. Les spectres ne correspondent pas à une enzyme totalement solvatée mais sont plus proches de l'uréase pure à l'état solide. Ces perturbations sont expliquées par les interactions des chaînes peptidiques et des surfaces hydroxylées des feuillettes.

Une étude a été réalisée sur le mode de séchage du matériau hybride soit par séchage à température ambiante suivi d'un broyage doux, soit par lyophilisation (Figure 24). Ce dernier procédé correspond au mode de séchage des enzymes commerciales et les conditions devraient améliorer l'activité enzymatique de l'uréase immobilisée. Les spectres ont été réalisés sur la phase [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] avec Q=1/3 ou 1. Dans chaque cas, la quantité d'enzyme est identique mais les spectres présentent quelques différences. L'enzyme immobilisée puis lyophilisée présente un spectre s'approchant de celui de l'uréase libre. En outre pour la même quantité, on observe un effet hyperchrome, c'est-à-dire que l'intensité de l'absorbance est plus importante provoquée par un changement du coefficient d'extinction molaire. Ce comportement confirme la présence de contraintes stériques plus importantes pour l'uréase confinée par coprécipitation.

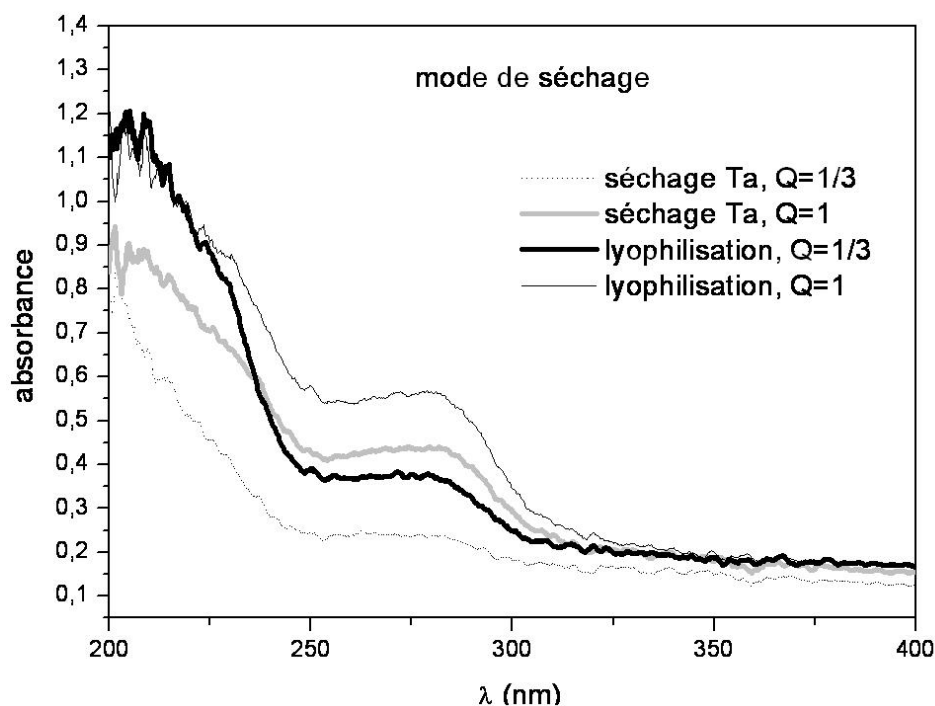


Figure 24 : Spectres UV des phases séchées à température ambiante et lyophilisées

Les déplacements et les changements d'intensité des bandes résultent d'un léger changement de la conformation 3D de l'uréase qui dépend du pH, de l'effet stérique de la matrice inorganique

(Q, mode de séchage) et des interactions uréase/uréase. Lors de son immobilisation, l'uréase n'est pas dénaturée.

### III.3.3 Etude morphologique

#### III.3.3.1 Perméabilité des phases hybrides HDL/Uréase coprécipitées

Afin de corréler les mesures électrochimiques du biocapteur (chapitre 6) avec la morphologie des matériaux, une étude sur la perméabilité de biomembranes HDL/Uréase a été entreprise. Ce travail a été réalisé au sein du LEOPR par Christine Mousty.

La mesure de perméabilité est une méthode très largement utilisée dans l'étude des matériaux d'électrodes et des capteurs pour évaluer les capacités de diffusion des substances actives ou des substrats à travers une membrane ou un matériau poreux massif. La perméabilité est la vitesse à laquelle un fluide pénètre les pores d'un solide. Elle a été réalisée sur une série d'échantillons hybrides HDL/uréase synthétisés par coprécipitation. Une biomembrane, réalisée à partir d'un mélange de matrice HDL et d'enzyme est déposée à la surface d'une électrode à disque tournant de carbone vitreux. Le principe consiste à mesurer la diffusion d'une sonde électrochimique, l'hydroquinone, à travers la biomembrane jusqu'à l'électrode. L'hydroquinone par sa neutralité électrique limite les interférences avec la charge de la biomembrane. Pour déterminer la perméabilité, on trace la variation du courant limite de diffusion en fonction de la vitesse de rotation de l'électrode ( $(1/I_{lim} = f(\omega^{-1/2}))$ ). Ces paramètres sont déterminés à partir des équations suivantes introduites par Gough et Leypoldt en 1979<sup>15</sup>.

$$I/i_{lim} = I/i_s + I/i_m \quad (1)$$

$$i_s = 0.62 n F A C^\circ D_s^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} \quad (2)$$

$$i_m = n F A K C^\circ D_m / \delta = n F C^\circ P \quad (3)$$

$$P_m = K D_m / \delta \text{ (cm s}^{-1}\text{)} \quad (4)$$

avec

$I_{lim}$  : densité de courant ( $A \text{ cm}^{-2}$ ) =  $i/A$

<sup>15</sup> Gough, D. A.; Leypoldt, J. K. *Anal. Chem.*, 51, 1979, 439- 44

A : surface de l'électrode (0.196 cm<sup>2</sup>)

n : nombre d'électron échangé (2 pour l'hydroquinone)

F : constante de Faraday ( 96500 C mol<sup>-1</sup>)

C° : (mol cm<sup>-3</sup>) concentration en hydroquinone (2mM = 2 10<sup>-6</sup> mol cm<sup>-3</sup>)

D° : coefficient de diffusion de l'hydroquinone (exemple) (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>)

v: viscosité de la solution (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) H<sub>2</sub>O 0,01

ω : vitesse angulaire (rad s<sup>-1</sup>) (2π f, f = fréquence de rotation en tours /sec)

Ds : coefficient de diffusion de l'hydroquinone en solution

Dm : coefficient de diffusion de l'hydroquinone dans la membrane.

δ : Épaisseur de la membrane

K : la constante d'équilibre du substrat entre la solution et la membrane

L'équation (1) est composée de deux termes, où le premier représente la densité de courant sous les mêmes conditions, en absence de membrane, et est donc caractéristique de la diffusion de l'hydroquinone dans la solution (équation 2). Le second terme est attribué à la diffusion du substrat dans la membrane et dépend du produit de la constante d'équilibre et de la constante de diffusion du substrat et de l'épaisseur du film. Seul le premier terme de l'équation est dépendant de la vitesse de rotation de l'électrode à disque tournant.

La droite obtenue doit être parallèle à celle obtenue à l'électrode nue avec un décalage à l'origine qui dépend de la perméabilité de la membrane (équations 3 et 4). Les valeurs des différents films hybrides sont données dans le Tableau 5.

**Tableau 5 : Perméabilité des différentes phases**

Q	Zn/Al	Pm (10 <sup>-2</sup> cm/s)
0	3	2,50
0	2	2,20
0	3	2,20
1/3	3	0,70
1/2	3	0,95
1	3	1,60
2	3	1,30
3	3	1,60
1/3	2	0,78
1/3	3	0,70
1/3	4	1,70

Il apparaît clairement que le matériau hybride présente une bonne perméabilité ( $0,7 - 1,6 \cdot 10^{-2}$  cm/s). Cependant, l'incorporation de la biomolécule dans l'hydroxyde double lamellaire affecte la perméabilité des biofilms résultants comparée à la perméabilité de la phase [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl] ( $2 \leq x \leq 4$ ,  $P_m = 2.2 - 2.5 \cdot 10^{-2}$  cm s<sup>-1</sup>). La diminution de la perméabilité devient moins notable avec des rapports uréase/HDL élevés. En diminuant la quantité d'uréase sur le matériau ou la charge de l'HDL (Zn<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup>), l'hydroquinone a tendance à s'accumuler à la surface de la biomembrane. Il semble donc évident que pour les rapports HDL/Uréase faibles ( $Q = 1/3$  ou  $1/2$ ) l'enzyme se fixe sur des sites d'adsorption indépendants les uns des autres et favorise l'agglomération des cristallites. Pour les échantillons à  $Q > 1$ , il existe des domaines d'enzymes où la diffusion d'hydroquinone est facilitée.

Les biomembranes réalisées avec des hydroxydes doubles lamellaires présentent une perméabilité élevée comparée à d'autres matrices lamellaires. J. V. De Melo et coll<sup>16</sup> ont montré que la perméabilité de biomembranes réalisées par dépôts d'HDL et d'uréase était de  $1,4 \times 10^{-2}$  cm/s alors qu'avec la laponite la perméabilité était de  $3,1 \times 10^{-3}$  cm/s. Ces résultats étaient en accord avec un meilleur temps de réponse des biocapteurs réalisés avec de l'HDL (5-10 s). Pour une biomembrane de laponite, le temps de réponse varie entre 1,5 à 4 minutes.

### III.3.3.2 Microscopie électronique à balayage

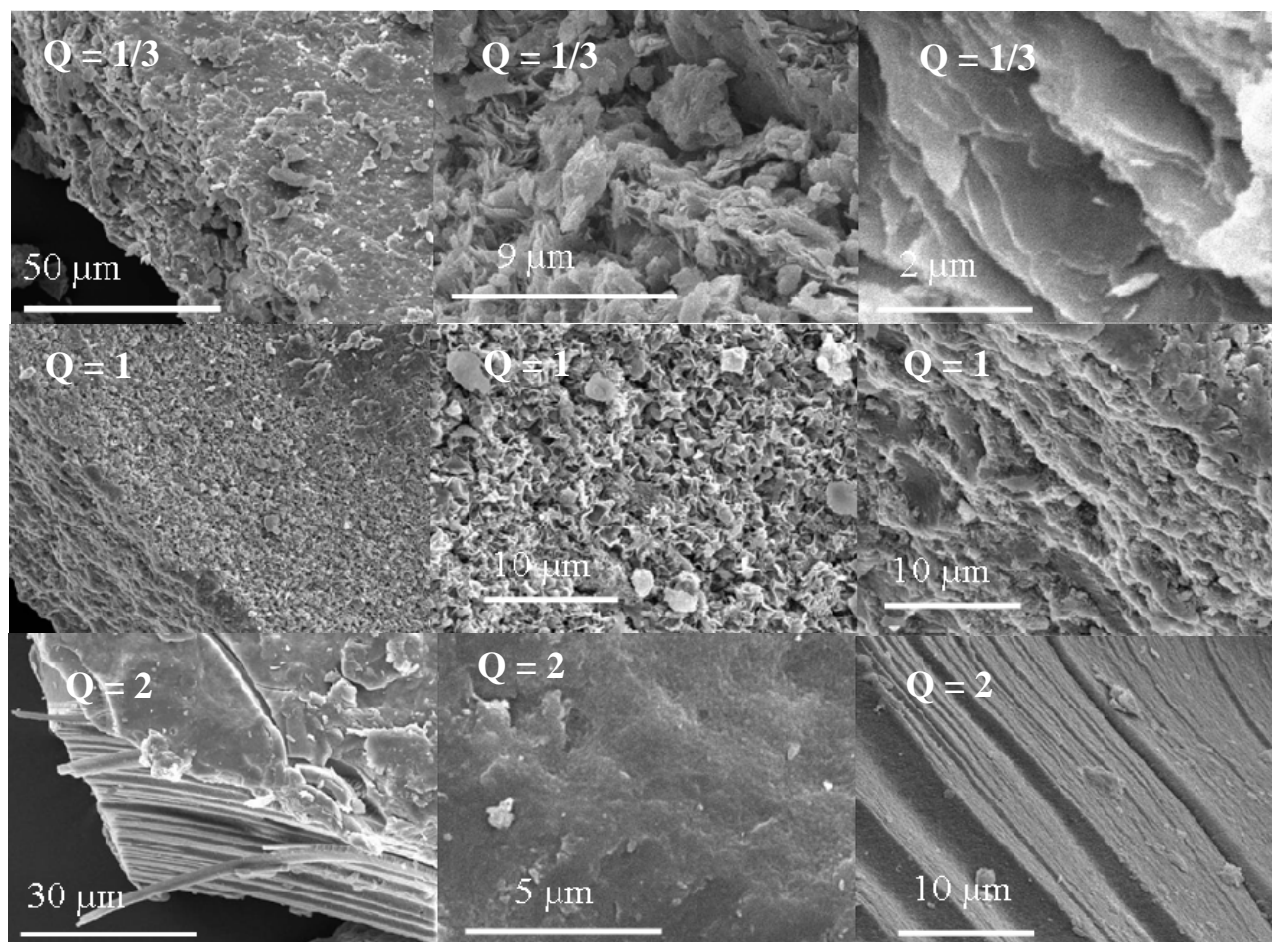
Les clichés de microscopie électronique à balayage des phases hybrides [Zn<sub>3</sub>Al-Urease] avec  $Q = 1/3$ , 1 et 2 sont représentés sur la Figure 25.

Pour rappel, une simple phase [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] coprécipitée présente une morphologie homogène de particules primaires de forme pseudo-hexagonale s'agrégeant sous forme de « rose des sables ». Lors du confinement de l'uréase par coprécipitation avec une phase HDL, une modification texturale significative apparaît. Les particules ont tendance à s'orienter préférentiellement. Deux observations peuvent être discutées en fonction de l'augmentation du rapport  $Q$ . Des plaquettes individuelles se disposent parallèlement les unes sur les autres, formant un film qui se densifie au fur et à mesure de l'augmentation de la quantité d'uréase. A la surface des agrégats, des particules d'HDL sont identifiées puis diluées dans un réseau bio-organique pour  $Q = 2$ .

<sup>16</sup> J. V. de Melo, S. Cosnier, C. Mousty, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Anal. Chem, 74, 2002, 4037-4043,



La présence de biomolécules lors de la précipitation des composés inorganiques influence nettement les propriétés morphologiques du matériau. Ces observations corroborent la forte affinité de l'urée pour la phase [Zn-Al-Cl].



**Figure 25 : Clichés MEB des matériaux hybrides Q=1/3, 1 et 2**

Il est à noter que le mode de séchage gouverne l'état d'agrégation du matériau hybride. La lyophilisation permet d'obtenir un matériau plus poreux. En effet, les clichés de microscopie électronique à transmission de la phase [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] avec Q = 1 montrent une texture plus aérée provoquée par la présence des plaquettes plus espacées et plus fines (Figure 26).

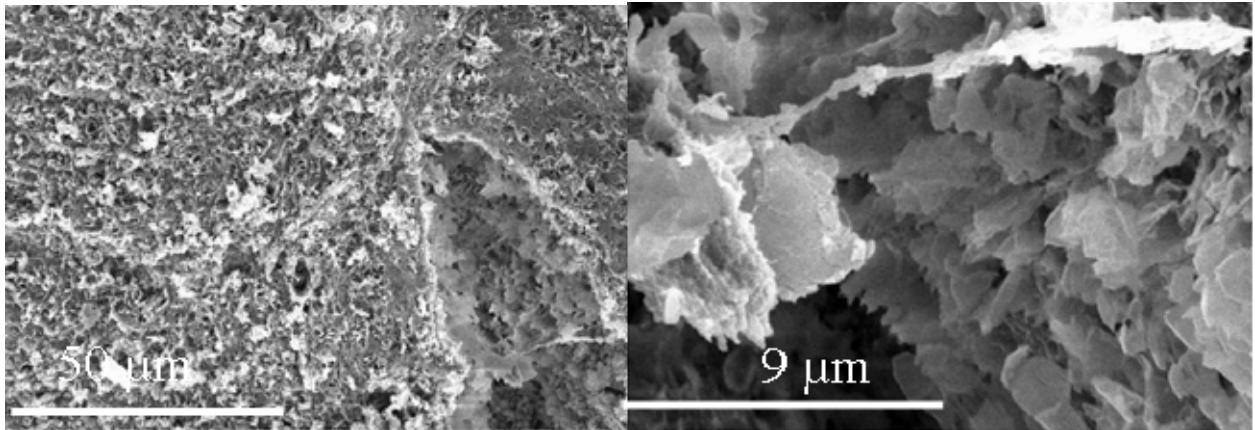


Figure 26 : Clichés MEB d'une phase hybride lyophilisée

### III.3.3.1 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission a été réalisée sur une phase [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] et sur la phase hybride [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] pour un rapport uréase/HDL Q = 1 (Figure 27).

Le cliché de la phase inorganique montre des particules individuelles bien distinctes de forme hexagonale et de taille inférieure à 500 nm. Par contre, en présence d'uréase, on observe un agglomérat formé d'uréase et de particules d'HDL agrégées. Aucune particule inorganique hexagonale bien définie n'est identifiée. Cependant, la présence de petites particules d'HDL (< 50 nm) est observée et semble être dispersée dans un film d'enzyme.

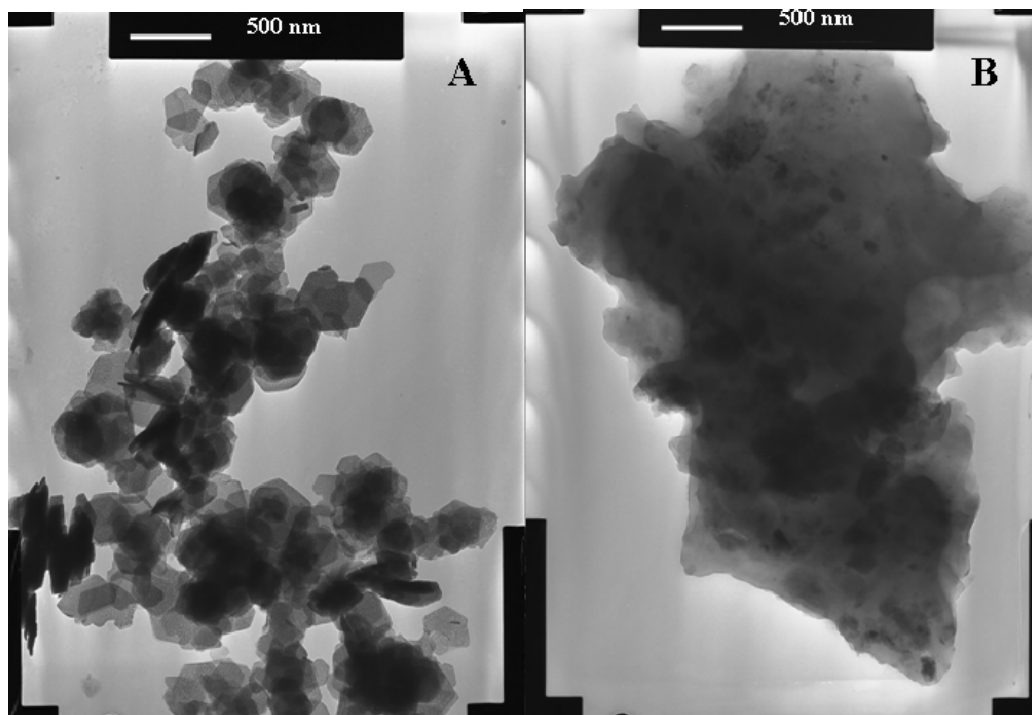


Figure 27 : Clichés MET de la phase [Zn<sub>3</sub>-Al-Cl] avec et sans uréase

## *IV Conclusion*

L'étude sur le confinement de l'uréase dans des phases hydroxydes doubles lamellaires [ZnAl] a montré la possibilité de former des matériaux hybrides quelle que soit la méthode de synthèse employée. Les synthèses directes soit par coprécipitation soit par délamination/réempilement entraînent l'immobilisation d'une quantité d'enzyme plus importante.

La méthode par coprécipitation permet de conserver le rapport uréase/HDL initial et ainsi de contrôler la quantité de biomolécules. Cependant un excès entraîne une saturation des sites d'adsorption et la présence de domaines riches en enzymes.

L'intercalation d'uréase entraîne un désordre structural au niveau de l'empilement des feuillets HDL. La matrice inorganique est dispersée dans un réseau bio organique et sa précipitation entraîne la formation de particules plus petites. Cependant, les méthodes spectroscopiques montrent que la structure 3-D de l'enzyme immobilisée est globalement préservée.

Une étude par absorption des rayons X au seuil K du zinc a révélé la présence d'une phase secondaire qui augmente avec la quantité d'uréase immobilisée. Dans cette phase, les ions Zn<sup>2+</sup> sont en coordinence 4 avec les atomes d'oxygène. Comme nous l'avons montré dans le cas de la coprécipitation à T = 40°C, l'hydroxyde de zinc est facilement converti par l'enzyme en zincite. Il semble donc qu'une augmentation de la concentration en uréase limite la coprécipitation Zn-Al totale peut-être par effet d'adsorption des cations métalliques à la surface de la protéine.

Le mode de séchage a révélé de nettes modifications structurales. La lyophilisation du matériau hybride provoque une structure plus aérée qui semble préserver la conformation de l'enzyme.

## Chapitre 5

### Elaboration de films $[\text{Zn}_R\text{-Al-Cl}]$ et $[\text{Zn}_R\text{-Al-Cl}]$ -Uréase par la méthode Langmuir Blodgett



## Sommaire

<b>I</b>	<b><i>Historique.....</i></b>	<b>199</b>
<b>II</b>	<b><i>Principe de la technique Langmuir - Blodgett .....</i></b>	<b>200</b>
<b>II.1</b>	<b><i>Les films Langmuir .....</i></b>	<b>201</b>
II.1.1	<i>Les molécules amphiphiles.....</i>	201
II.1.2	<i>Pression de surface .....</i>	202
<b>II.2</b>	<b><i>Les isothermes Pression – Surface <math>\pi</math> - A .....</i></b>	<b>203</b>
<b>II.3</b>	<b><i>Transfert des films Langmuir .....</i></b>	<b>205</b>
<b>II.4</b>	<b><i>Transfert de films Langmuir incluant des protéines. ....</i></b>	<b>207</b>
<b>III</b>	<b><i>Etude Bibliographique.....</i></b>	<b>207</b>
<b>III.1</b>	<b><i>Films LB d'uréase .....</i></b>	<b>207</b>
<b>III.2</b>	<b><i>Films LB d'argile .....</i></b>	<b>209</b>
III.2.1	<i>Films LB d'argile cationique .....</i>	209
III.2.2	<i>Films LB d'Hydroxyde Double Lamellaire.....</i>	211
<b>IV</b>	<b><i>Protocole expérimental .....</i></b>	<b>214</b>
<b>IV.1</b>	<b><i>Préparation des différents films.....</i></b>	<b>214</b>
IV.1.1	<i>Préparation de films acide béhenique/[Zn-Al-HDL] .....</i>	214
IV.1.2	<i>Préparation de films acide béhenique/Zn-Al-HDL/uréase .....</i>	215
<b>IV.2</b>	<b><i>Résultats et discussion.....</i></b>	<b>216</b>
IV.2.1	<i>Isothermes pression- aire des différents films LB .....</i>	216
IV.2.1.1	<i>Etudes préliminaires .....</i>	216
IV.2.1.2	<i>Etude de la formation de films LB dans le système binaire [Zn-Al]-BA .....</i>	219
IV.2.2	<i>Etude de la formation de films LB dans le système ternaire [Zn-Al]-Uréase-BA..</i>	226
IV.2.3	<i>Isotherme pression temps d'équilibre. ....</i>	229
IV.2.4	<i>Etude de la stabilité des films LB: les isobares aire –temps .....</i>	231
<b>IV.3</b>	<b><i>Mise en œuvre des transferts de films LB sur substrats .....</i></b>	<b>234</b>

IV.3.1	<i>Etude du transfert.....</i>	234
IV.3.2	<i>Quantification du transfert.....</i>	235
<b>V</b>	<b><i>Caractérisations des films préparés .....</i></b>	<b>238</b>
V.1	<i>Etude sur la mouillabilité des films déposés.....</i>	238
V.2	<i>Etude structurale par diffraction des rayons X.....</i>	239
V.3	<i>Caractérisation des couches par les techniques de microscopie .....</i>	241
V.3.1	<i>Etude par microscopie optique et microscopie électronique à balayage .....</i>	241
V.3.2	<i>Etude par microscopie à force atomique .....</i>	243
<b>VI</b>	<b><i>: Discussion.....</i></b>	<b>248</b>
<b>VII</b>	<b><i>Conclusion.....</i></b>	<b>252</b>

Le développement technologique de dispositifs électrochimiques tels que les biocapteurs passe en dernier lieu par la maîtrise de la mise en forme des matériaux sur les électrodes sensibles afin d'optimiser les performances physiques et les dimensions spatiales. La réalisation de films minces de matériaux actifs par la technique Langmuir – Blodgett a été largement développée pour l'élaboration de biocapteurs. Cette technique permet aussi d'élaborer des films minces nanostructurés associant des composantes différentes. Le caractère bidimensionnel des feuillets HDL est très approprié à l'élaboration de couches et peut aussi intervenir pour renforcer l'organisation en couches des films formés. Ce chapitre porte sur l'élaboration de films d'hydroxydes doubles lamellaires par la technique Langmuir-Blodgett et sur l'immobilisation de l'uréase dans ces films pour l'élaboration de biocapteurs à urée.

## *1 Historique*

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, le physicien américain Langmuir et son assistante Miss Blodgett mirent au point des films qui portent actuellement leurs noms : les films Langmuir – Blodgett.

Mais, l'histoire des ces films débuta bien plus tôt, en 1774, quand Benjamin Franklin laissa tomber un peu d'huile dans l'eau. Il observa que la goutte d'huile s'étalait à la surface avec une surprenante rapidité, occupait une surface importante et était aussi lisse que du verre. Il rapporta ainsi sa découverte à la British Royal Society<sup>1</sup>.

Un siècle plus tard, Lord Rayleigh recommanda les travaux d'une allemande Agnes Pockels dans Nature<sup>2</sup>. A. Pockels, après des expériences réalisées dans des conditions rudimentaires, détermina le comportement de la pression de surface par contamination avec différentes huiles. Confirmant ces travaux, Lord Rayleigh conclut qu'il se formait une « monocouche » d'huile à la surface de l'eau.

Irwing Langmuir fut le premier à améliorer l'étude sur les monocouches déposées à la surface de l'eau. Vers 1920, il a rapporté le transfert de molécules d'acides gras<sup>3</sup> répandues sur l'eau

---

<sup>1</sup> B. Franklin, Philos; Trans. R. Soc; London, 64, 1774, 445

<sup>2</sup> A. Pockels, Nature (London), 43, 1991, 437

<sup>3</sup> I. Langmuir., Journal of the American Chemical Society, 39, 1917 1848-1906.



sur un support solide. Cependant, les premières descriptions détaillées sur le transfert de monocouches furent publiées quelques années plus tard par Katherine Blodgett<sup>4, 5</sup>.

En France, c'est le physicien André Barraud du CEA-Saclay qui a développé cette technique afin d'en faire une procédure reproductible de production de films monomoléculaires exploitables dans diverses applications<sup>6</sup> allant des procédés de microgravures<sup>7</sup> aux biocapteurs<sup>8</sup>.

## II Principe de la technique Langmuir - Blodgett

La technique de Langmuir – Blodgett consiste à déposer à la surface d'une eau ultra – pure (appelée sous-phase) une petite quantité de molécules amphiphiles. Ces molécules vont former un film monomoléculaire à l'interface eau/air. Après compression du film à l'aide d'une barrière mobile, le film de molécules amphiphiles est transféré sur un support solide. La Figure 1 montre le dispositif expérimental pour élaborer des films de Langmuir – Blodgett (films LB)

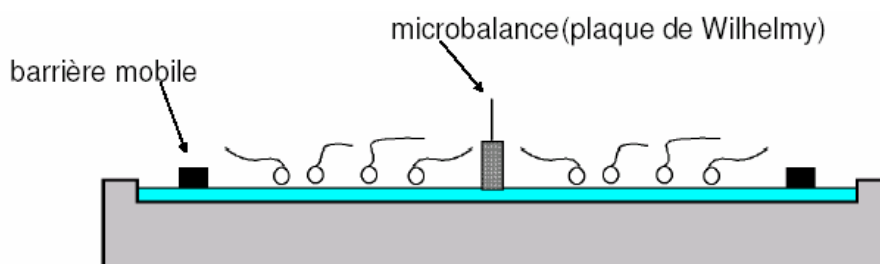


Figure 1 : Dispositif de la technique Langmuir – Blodgett

<sup>4</sup> K. Blodgett, Journal of the American Chemical Society, 57, 1935, 1007-1022.

<sup>5</sup> K. Blodgett, Journal of the American Chemical Society, 56, 1934, 495.

<sup>6</sup> G. Roberts, B. Holcroft, A. Barraud, J. Richard, Thin Solid Films, 160, 1988, 53-60.

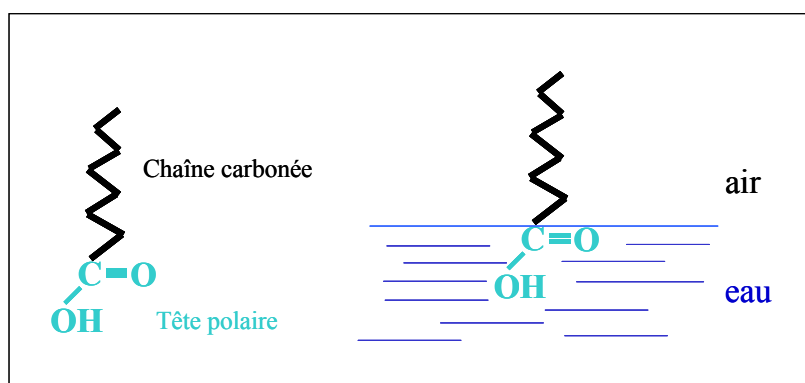
<sup>7</sup> A. Barraud, J. Messier, A. Ruaudel, Fr. Demande, 1979, 10 pp

<sup>8</sup> A. Barraud, H. Perrot, V. Billard, C. Martelet, J. Therasse, Biosensors & bioelectronics 8 (1), 1993, 39-48.

## II.1 Les films Langmuir

### II.1.1 Les molécules amphiphiles

Les molécules amphiphiles<sup>9</sup> sont constituées d'une partie hydrophile (soluble dans l'eau) et d'une partie hydrophobe (insoluble dans l'eau). La partie hydrophobe constituée généralement d'une chaîne carbonée ou fluorée préfère éviter le contact avec l'eau alors que la partie hydrophile constituée d'un groupement polaire (-OH, -COOH, -NH<sub>3</sub>, etc) a tendance à se solubiliser dans l'eau (Figure 2). L'interface air-eau va donc constituer un milieu favorable pour ces molécules. Leur solubilité dépend de la longueur de la chaîne aliphatique, du pH de l'eau (de l'ionisation de la tête polaire) et de la température.

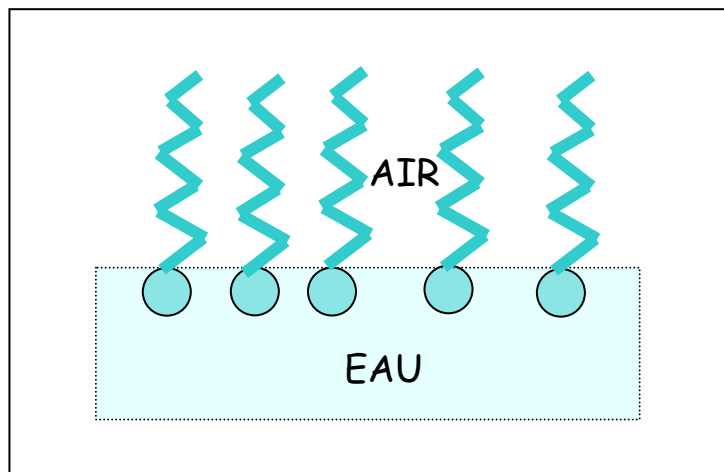


**Figure 2 : Représentation d'une molécule amphiphile et de son attitude à l'interface air-eau**

Quand la molécule amphiphile vient en contact avec l'eau, elle s'accumule à l'interface air-eau diminuant alors la tension de surface d'où leur nom de tensioactifs ou surfactants.

Ces molécules amphiphiles sont dissoutes dans un solvant volatile et insoluble dans l'eau tel que le chloroforme. Cette solution est déposée à l'interface air-eau. Il y a alors dispersion du tensioactif sur la surface de l'eau et évaporation du solvant laissant une monocouche de molécules (Figure 3). Ces monocouches sont appelées films Langmuir. La nature de la molécule amphiphile dicte l'orientation des molécules à l'interface de telle façon que la tête polaire s'immerge dans l'eau et que la longue chaîne carbonée pointe sa queue vers l'air.

<sup>9</sup> S. Rivière – Cantin, Thèse de l'université Paris VI, 1995



**Figure 3 : Représentation d'une monocouche de molécules amphiphiles à l'interface air-eau**

### II.1.2 Pression de surface<sup>10</sup>

L'interface air-eau possède une énergie libre venant de la différence d'énergie entre les molécules de surface et les molécules au cœur du volume. L'énergie libre superficielle est accessible par la mesure de la tension superficielle,  $\gamma$ , elle correspond au travail,  $dW$ , réalisé par la surface au cours d'une variation d'aire  $dA$ :

$$dW = -\gamma dA = -dG$$

La tension de surface de l'eau est d'environ 73 mN/m à 20°C et à pression atmosphérique. Cette valeur est élevée comparée à celle d'autres liquides et par conséquent fait de l'eau une très bonne sous-phase pour l'étude de monocouches.

Quand une solution de molécules amphiphiles dissoutes dans un solvant non miscible à l'eau est déposée à la surface de ce liquide, la solution se répand et couvre l'aire disponible. Une fois le solvant évaporé, une monocouche se forme. Quand l'aire disponible pour la monocouche est grande, la distance entre les molécules adjacentes est grande et leurs interactions faibles. La monocouche peut donc être considérée comme un gaz à deux dimensions. Sous ces conditions, la monocouche a un petit effet sur la tension de surface de l'eau. Si l'aire moléculaire est réduite par un système de barrière mobile, les molécules

<sup>10</sup> Kai Wan, Thèse de l'école centrale de Lyon, 1999

commencent à exercer un effet de répulsion entre elles. Ce phénomène entraîne une pression de surface  $\pi$  qui est donnée par la relation suivante :

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

( $\gamma_0$  et  $\gamma$  représentent respectivement la tension superficielle de la solution aqueuse et celle du film monomoléculaire à l'interface air/eau).

## II.2 Les isothermes Pression – Surface $\pi$ - A

L'indicateur le plus important concernant les propriétés des monocouches de molécules amphiphiles est donné en mesurant la pression de surface ( $\pi$ ) en fonction de l'aire moléculaire (A). Cette mesure s'effectue à température constante et nous permet donc d'obtenir un isotherme pression-surface ou isotherme  $\pi$  - A. Cet isotherme est obtenu en comprimant le film (c'est à dire en réduisant l'aire de la surface par des barrières) à vitesse constante et en mesurant la pression de surface par l'intermédiaire d'une balance de Wilhelmy. L'isotherme dépend de la molécule amphiphile utilisée (longueur de la chaîne carbonée, tête polaire), de la quantité ajoutée, du pH et de la température de la sous-phase. La Figure 4 présente un isotherme de compression théorique.

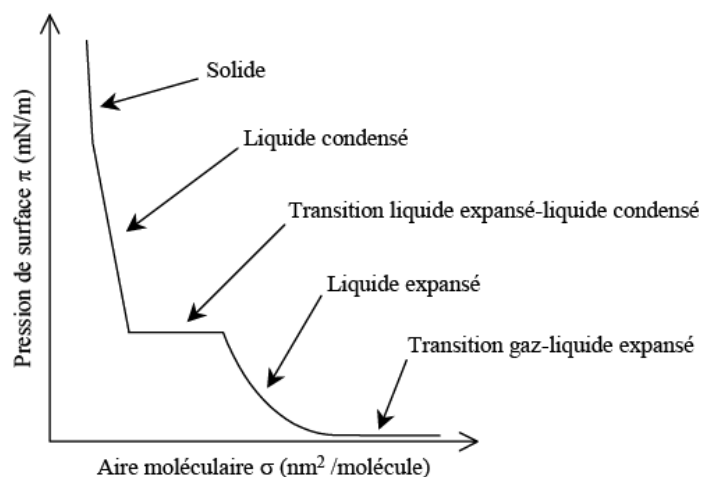


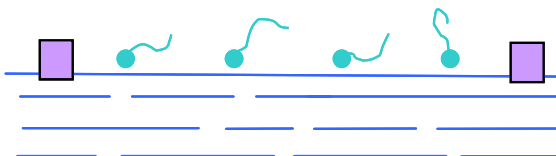
Figure 4 : Représentation d'un isotherme  $\pi$ -A théorique<sup>11</sup>

<sup>11</sup> D. Tareste, Thèse à l'Université Paris VI, Paris, 2002

On distingue plusieurs phases apparentes. Lorsque l'aire par molécule décroît<sup>10</sup>, le film passe successivement par les phases gazeuse, liquide expansé, liquide condensé, puis solide, avant la rupture.

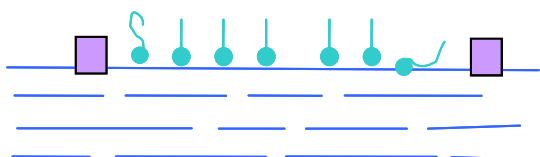
La phase gazeuse :

Les molécules sont éloignées les unes des autres sans aucun ordre de positions ; les chaînes sont désordonnées et probablement couchées à la surface de l'eau.



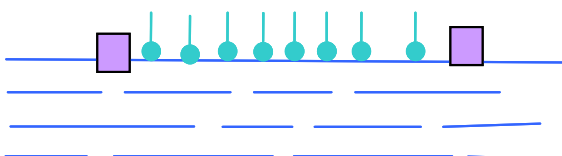
La phase liquide expansée :

Les molécules se rapprochent ce qui augmente la pression de surface, cependant l'arrangement moléculaire n'est pas encore parfait. Les molécules sont en faibles interactions et les chaînes sont désordonnées.



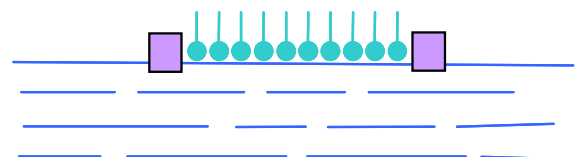
La phase liquide condensée :

Les molécules sont maintenant inclinées par rapport à la normale à la surface de l'eau mais elles gardent leur liberté de rotation.



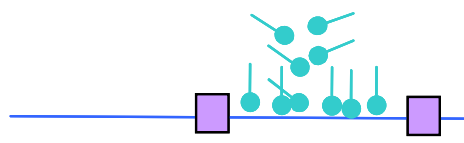
La phase solide :

Les molécules perdent leur liberté de rotation et sont ordonnées en un cristal bidimensionnel. Le réseau moléculaire est compact.



La phase rupture :

Si l'on poursuit la compression, les molécules amphiphiles quittent la surface de l'eau pour partir en solution ou forment des multicouches à l'interface air-eau.



L'isotherme obtenu permet de définir les conditions de transfert de la monocouche de molécule amphiphile sur un support. Afin d'obtenir un film homogène, il est nécessaire de tremper le substrat lorsque le film monomoléculaire à l'interface air-eau est le plus stable. D'après l'analyse des différentes phases de transition, la phase solide caractérise l'état « parfait » du film. Il est donc nécessaire avant tous dépôts de définir cette phase.

### II.3 Transfert des films Langmuir

Le film de Langmuir est comprimé à une pression de surface comprise dans la phase solide S puis est transféré sur un support solide placé verticalement par rapport à la surface. Le substrat est plongé dans la solution puis retiré à vitesse constante. Les molécules amphiphiles sont alors adsorbées à la surface du substrat. En raison du phénomène de capillarité, le film se fixe sur le support avec une bonne adhésion (Figure 5).

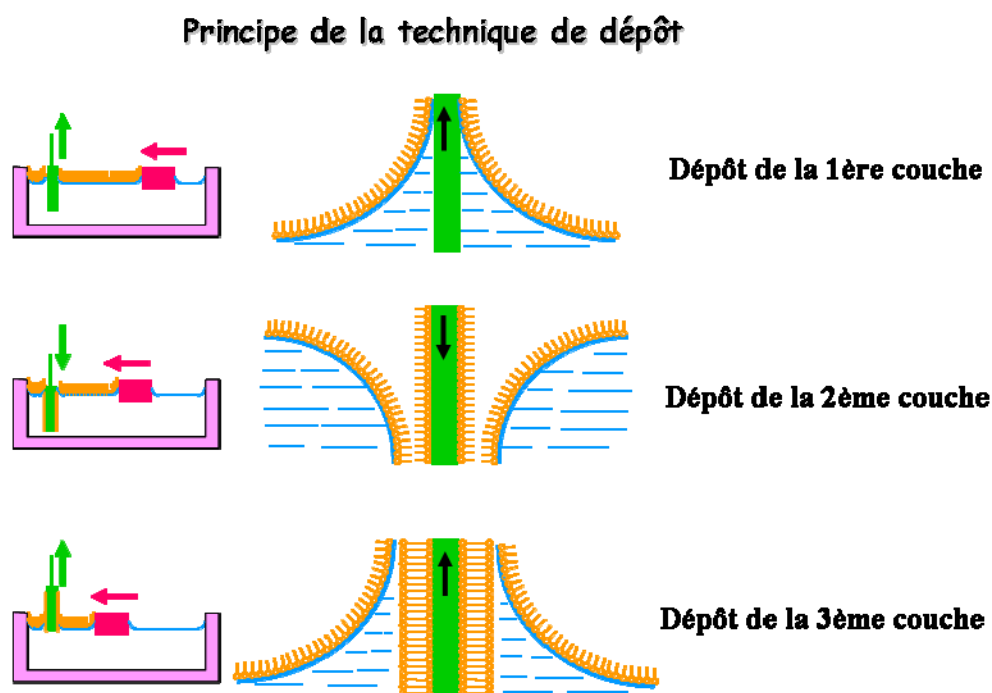


Figure 5 : Transferts de la monocouche de molécules amphiphiles sur un substrat hydrophile

Le mécanisme d'adsorption dépend de la nature hydrophobe ou hydrophile du support. Dans le premier cas, la queue hydrophobe se fixe au support lors de l'immersion. Durant l'émersion, le ménisque s'inverse et le support se recouvre d'une seconde monocouche, tête hydrophile à l'opposé de celle préalablement déposée. Dans le cas où le support est hydrophile, le transfert s'effectue de façon opposée.

Il existe trois type de dépôts : type X, Y et Z (Figure 6).

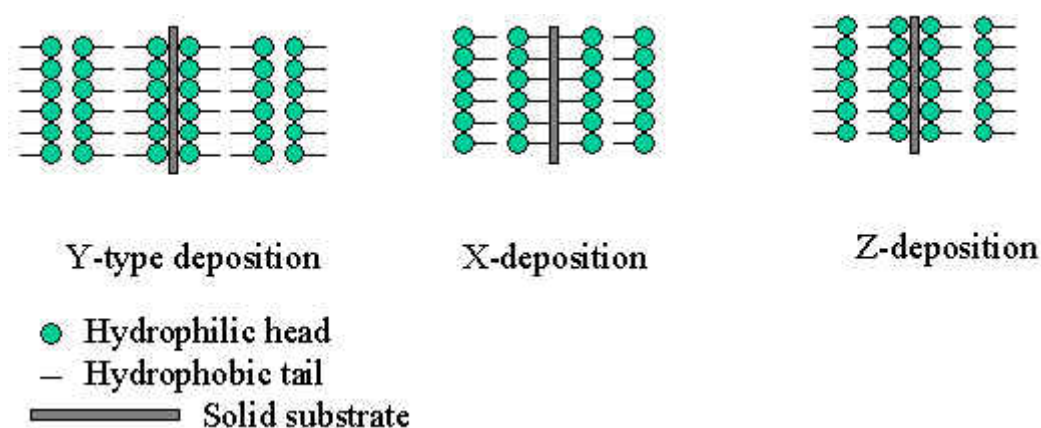


Figure 6 : Différents types de dépôts

La configuration la plus courante est celle de type Y. Elle correspond à des dépôts de molécules le plus souvent très stables car il coexiste des interactions hydrophobe-hydrophobe et hydrophile-hydrophile entre les couches. Pour la configuration de type X, la monocouche ne se transfère qu'à l'immersion (support hydrophobe) alors que pour la configuration Z, elle ne se transfère qu'à l'émersion (support hydrophile). Dans ces deux types de configuration, les interactions sont de type hydrophile-hydrophobe ce qui fait que les multicouches sont moins stables que celles de type Y. Toutefois, il s'est avéré que de nombreux dépôts soi-disant de type X ou Z d'après le relevé de transfert, étaient, après analyse par rayons X de type Y.

Le transfert est une étape importante dans la fabrication des films LB et plusieurs facteurs sont à maîtriser pour l'optimisation de cette étape :

- la qualité de la monocouche à l'interface eau-air (homogénéité, stabilité),
- la nature de la sous-phase (pH, pureté, force ionique),
- la vitesse de traversée de l'interface,
- l'angle de pénétration du substrat dans la sous-phase,
- la nature du support (qualité de surface, composition chimique, etc),
- la température de la sous-phase,
- la pression de transfert.

## II.4 Transfert de films Langmuir incluant des protéines.

Un des avantages de la technique Langmuir - Blodgett est de pouvoir biofonctionnaliser les dépôts en faisant des films non plus de molécules amphiphiles uniquement mais de films amphiphiles/protéines (Figure 7). La protéine est dissoute dans la sous-phase et s'adsorbe sous l'amphiphile via des interactions électrostatiques. La force des interactions dépend de la molécule amphiphile et de la protéine.

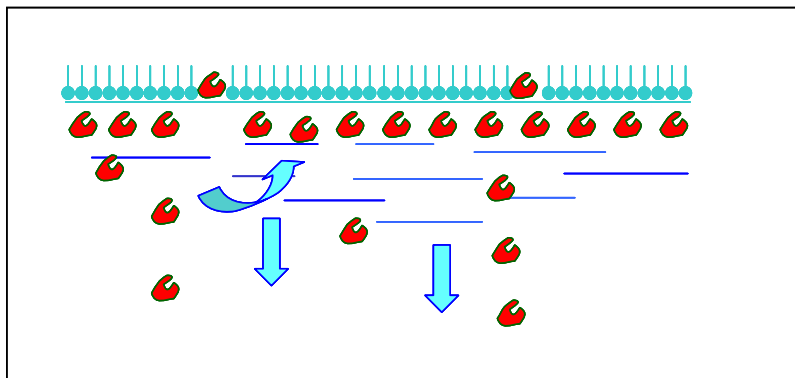


Figure 7 : Interactions des protéines avec la monocouche de molécules amphiphiles

## III Etude Bibliographique

Dans le cadre de cette étude bibliographique, nous présenterons seulement les travaux concernant des films de Langmuir Blodgett d'uréase et d'argile, notamment les Hydroxydes Doubles Lamellaires.

### III.1 Films LB d'uréase

La première publication<sup>12</sup> sur l'étude de films d'uréase a été écrite par I. Langmuir en 1938. Il dépose à la surface de l'eau de l'uréase puis transfère les monocouches sur différents substrats activés ou non activés chimiquement. Il montre alors que ces dépôts sont stables et maintiennent leur épaisseur (20Å).

Depuis, d'autres travaux ont été effectués avec l'objectif d'élaborer des biocapteurs à urée.

<sup>12</sup> I. Langmuir, V. J. Schaefer, Vincent, J. of the American Chemical Society, 60, 1938,1351-60.



En effet, en 1995, une étude<sup>13</sup> s'est portée sur la préparation de films d'uréase transférés sur des supports silanisés ou non pour la fabrication de biocapteurs potentiométriques (PAB). Ces derniers ont une application médicale au niveau du métabolisme cellulaire. Ces travaux ont montré la possibilité d'obtenir une méthode d'immobilisation stable de protéines pour des tests immunoenzymatiques. Il faut noter cependant que les mesures d'activité sont meilleures quand la protéine est déposée sur un substrat silanisé qui permet le greffage covalent de la biomolécule.

Récemment, Jaffrezic et al ont préparé des films mixtes amphiphile/uréase<sup>14, 15</sup> et évalué leurs performances comme biocapteurs. Le but de leur travail se focalise sur l'optimisation des conditions de formation de monocouches mixtes stables à l'interface air-eau, sur le transfert de ces monocouches et sur les caractéristiques des biocapteurs. Deux molécules amphiphiles ont été étudiées : l'octadécylamine (ODA) et l'acide béhenique (BA). Dans les conditions expérimentales (pH = 5), l'ODA est chargée positivement alors que le BA est plutôt neutre. L'enzyme de charge négative interagit plus facilement avec l'ODA ce qui se traduit par une vitesse d'absorption plus rapide. Afin d'obtenir un bon transfert et par conséquent un dépôt de bonne qualité, le film obtenu après compression doit être stable. Les résultats ont montré que l'augmentation de la concentration d'uréase (4 à 8 mg/L) et une température basse (5°C au lieu de 20 °C) entraînaient l'amélioration de la stabilité. Par conséquent, le dépôt d'uréase pour l'élaboration du biocapteur a été réalisé à 5°C, avec l'ODA, et 8 mg/L d'enzyme.

Ils se sont ensuite intéressés à la formation de monocouches d'uréase<sup>16</sup> à l'interface air – eau. L'isotherme pression-air et la stabilité des monocouches ont été étudiés en fonction de la concentration d'uréase et du pH de la solution. En augmentant la quantité d'uréase (4 à 12 mg/l) ou en diminuant le pH (7,3 à 5,5), la pression de surface augmente en fonction du temps. Dans le premier cas, la vitesse d'adsorption des molécules d'uréase à l'interface air-eau est proportionnelle à la concentration. Dans le deuxième cas, à pH = 5,5, la biomolécule

<sup>13</sup> S. Paddeu, A. Fanigliulo, M. Lanzi, T. Dubrovsky, C. Nicolini, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, B25(1-3), 1995, 876-82.

<sup>14</sup> A. Hang, Y. Hou, N. Jaffrezic-Renault, J. Wan, A. Soldatkin, J.M. Chovelon, *Bioelectrochemistry*, 56(1-2), 2002, 157-158

<sup>15</sup> A. Hang, N. Jaffrezic-Renault, J. Wan, Y. Hou, J.M. Chovelon, *Materials Science & Engineering, C: Biomimetic and Supramolecular Systems*, 21(1-2), 2002, 91-96

<sup>16</sup> Y. Hou, Yanxia, N. Jaffrezic-Renault, A. Zhang, J. Wan, A. Errachid, J.M. Chovelon, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, B86(2-3), 2002, 143-149.

dont le p.i.e est de 5 présente un caractère plus hydrophobe qui favorise l'adsorption en surface. Comparée aux isothermes  $\pi$ -A en présence de molécules amphiphiles, la pression de surface augmente plus lentement lors de la compression du film. Par exemple, pour une aire moléculaire de 25 Å<sup>2</sup>, la pression de surface en présence de BA est d'environ 40 mN/m alors qu'en absence de molécule amphiphile elle est de 28 mN/m. En outre, les isothermes obtenus avec différentes concentrations montrent des différences notables alors que ceux obtenus pour les films d'uréase se superposent. Cependant, les films d'uréase sont plus stables que les films mixtes. Les conditions de transfert ont été déterminées de la façon suivante : 8mg/L et pH = 6,5.

### **III.2 Films LB d'argile**

La construction de matériaux nanostructurés organique/inorganique est une importante cible pour la recherche de matériaux à propriétés nouvelles. La recherche est motivée dans le but de développer des matériaux fonctionnels tels que des capteurs, des matériaux pour l'optique non linéaire. L'association de feuillets inorganiques aux films LB permet de renforcer la structure lamellaire du film.

#### **III.2.1 Films LB d'argile cationique**

Yamagishi et coll.<sup>17</sup> ont développé une méthode pour préparer des films hybrides argile/complexe métallique. L'amphiphile cationique dissous dans du chloroforme est déposé à la surface d'une suspension d'argile. La formation du film mixte a lieu par adsorption des particules d'argile chargées négativement sur la monocouche cationique. En enregistrant la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire, ils en ont déduit dans un premier temps la formation d'un film d'amphiphile, puis celle d'un film mixte amphiphile-argile. Cette observation est caractérisée par à un changement d'allure de la courbe indiquant une aire moléculaire plus importante pour les films d'argile.

Différents systèmes molécules amphiphiles- argiles ont été étudiés tels que :

- [Ru(phen)<sub>2</sub>(dC18bpy)]<sup>2+</sup> - hectorite<sup>17</sup>
- triméthylstéarylammmonium - saponite synthétique<sup>18</sup>.
- [Os(phen)<sub>2</sub>(dC<sub>18</sub>bpy)] (ClO<sub>4</sub>)<sup>2+</sup> - saponite naturelle, montmorillonite, hectorite<sup>19</sup>

<sup>17</sup> K. Tamura, H. Setsuda, M. Taniguchi, A. Yamagishi, Langmuir, 15, 1999, 6915-6920

<sup>18</sup> K. Inukai, Y. Hotta, S. Tomura, M. Takahashi, A. Yamagishi, Langmuir, 16, 2000, 7679-7684

- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dC}_{12}\text{bpy})]^{2+}$  - saponite<sup>20</sup>
- alkylammonium - saponite<sup>21</sup>

Ces travaux ont montré que les isothermes des films complexes / argiles pouvaient être influencés par :

- la concentration d'argile<sup>20,21</sup>. En diminuant la concentration en argile, les isothermes tendent à se rapprocher de celui de la molécule amphiphile. La charge positive du surfactant peut être neutralisée par la charge négative des plaquettes d'argile quand la monocouche est formée. La compatibilité de charges entre amphiphiles et feuillets minéraux conduit à un auto-assemblage optimal qui se traduit par la contraction de l'aire moléculaire du film.
- la nature de l'argile<sup>19</sup>. L'utilisation d'une matrice de capacité d'échange cationique élevée a montré la formation de films plus denses (Hectorite > Montmorillonite > Saponite)
- la longueur de la chaîne<sup>21</sup>. Des films hybrides de particules de saponite et de sels alkylammoniums de longueur de chaînes comprise entre  $\text{C}_4$ - $\text{C}_{18}$  ont pu être préparés par la technique Langmuir - Blodgett. Pour les molécules non solubles ( $\text{C}_{18}$ ), la formation du film monomoléculaire est gouvernée par la compétition entre la formation de domaines à l'interface air/eau et l'adsorption des particules d'argile. Pour les molécules solubles ( $\text{C}_4$ - $\text{C}_{12}$ ), il y a compétition d'un point de vue thermodynamique et cinétique entre la dissolution de la molécule organique dans la suspension aqueuse et l'adsorption des particules minérales à l'interface air-eau. Si la molécule est déposée sur l'eau pure, aucune élévation de pression n'a lieu, le film de Langmuir – Blodgett est instable. Par contre si elle est déposée sur une suspension d'argile, la pression augmente et confirme l'élaboration de films hybrides à l'interface air-eau. La diminution de la chaîne latérale entraîne une diminution de l'aire moléculaire ( $1 \text{ nm}^2$  pour  $\text{C}_{12}$  et  $0,12 \text{ nm}^2$  pour  $\text{C}_4$ ). En effet, plus la molécule amphiphile sera soluble et plus il sera difficile de former un film à la surface.

Une fois les dépôts réalisés, l'étude par microscopie à force atomique montre dans tous les cas, la formation d'un film uniforme formé de domaines de plusieurs centaines de nanomètres en largeur et d'une dizaine de nanomètre en épaisseur. Dans de rares cas, des particules isolées sont observées. L'épaisseur des particules a été estimée à  $1,5 \pm 0,5 \text{ nm}$ .

<sup>19</sup> K. Okamoto, K. Tamura, M. Takahashi, A. Yamagishi, Colloids and Surface. A: Physicochemical and Engineering Aspects, 169 (2169), 2000, 241-249

<sup>20</sup> Y. Umemura, A. Yamagishi, R. Shoonheydt, A. Persoons, F. De Schryver, JACS, 124 (6), 2002, 992-997

<sup>21</sup> A. Yamagishi, R. Shoonheydt, A. Persoons, F. De Schryver, Langmuir, 17, 2001, 449-455

L'utilisation d'argile peut influencer les procédés moléculaires tels que des réactions de transferts d'électrons. Par exemple, des films ont été préparés à partir de deux complexes métalliques amphiphiles dans différentes couches. Une des molécules (polypyridyl-Ru(II)) agit comme donneur d'électron quand elle est excitée par la lumière alors que l'autre (acétylacétano-Ru(III)) agit comme accepteur d'électron. Le processus de transfert d'électrons a été mis en évidence uniquement pour des films contenant les deux complexes. Par contre, pour des films hybrides avec la saponite, le transfert ne peut pas se faire ce qui implique que l'argile agit comme une barrière.

Cette technique permet d'ouvrir de nouvelles perspectives pour la préparation de films minces orientés présentant des propriétés de noncentrosymétrie. Un article a montré la préparation de multicouches suivant deux méthodes. La première consiste à déposer horizontalement des monocouches hybrides sur des substrats hydrophiles. Pour la deuxième méthode, la surface hydrophile de la monocouche transférée est rendue hydrophobe en la plongeant dans une solution aqueuse de chlorure d'octadécylammonium ( $ODA H^+ Cl^-$ ). Cette expérience entraîne un transfert suivant le mode Z. Il a été montré que dans les films minces préparés par la première méthode l'orientation des complexes de Ru(II) est aléatoire et l'assemblage fragilisé. Par la seconde méthode, les films présentent une structure mieux définie car le complexe amphiphile est orienté d'une seule façon. L'organisation de la molécule amphiphile peut être stabilisée entre la couche hydrophobe  $ODA H^+$  et la couche hydrophile de l'argile.

### III.2.2 Films LB d'Hydroxyde Double Lamellaire

Yamagishi et al<sup>22-25</sup> ont utilisé la technique de Langmuir – Blodgett pour préparer des films hybrides HDL/complexe métallique analogues à ceux réalisés avec des smectites<sup>17-20</sup>. Les molécules amphiphiles utilisées sont alors des amphiphiles anioniques pour satisfaire aux propriétés d'interface dans le système ternaire Eau-HDL-Air. L'association amphiphile-HDL a lieu par adsorption des particules d'argile chargées positivement sur la monocouche anionique. La formation de films mixtes est confirmée par la modification des isothermes  $\pi$ -A et par microscopie à angle de Brewster lors de leur compression.

Différents systèmes molécules amphiphiles/ HDL ont été étudiés tels que :

- $[\text{Ru}(\text{CN})_4(\text{dc18bpy})]^{2-}/[\text{Ni}_3\text{-Al-Cl}]$  <sup>22</sup>
- $(\text{K}_2[\text{Ru}(\text{CN})_4\text{L}]) / [\text{Mg}_3\text{-Al-Cl}]$  ou  $[\text{Ni}_3\text{-Al-Cl}]$  <sup>23</sup>
- $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{COO}^-)/[\text{Mg}_3\text{-Al-NO}_3]$  <sup>24</sup>
- $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COO}^-)/[\text{Mg}_{4,5}\text{Al}_2(\text{OH})_{13}\text{Cl}_2], [\text{Mg}_{4,5}\text{Al}_2(\text{OH})_{13}\text{Dendrimère}]$  <sup>25</sup>

Les isothermes  $\pi$ -A obtenus à partir des complexes de Ruthénium<sup>22,23</sup> montrent des aires moléculaires plus petites en présence d'HDL. Ces contractions sont expliquées par une réduction de la répulsion électrostatique des têtes chargées négativement des molécules amphiphiles lors de leur fixation sur les feuilletts positifs des HDL. En outre, une étude<sup>22</sup> sur la formation du film avec des rapports massiques Mg/Al différents indique que la densité de charge n'affecte pas le degré de contraction des films. Par contre, dans le cas d'utilisation de carboxylate<sup>24,25</sup> à longue chaîne carbonée, l'aire moléculaire augmente. Par exemple, elle passe de 0,195 nm<sup>2</sup> à 0,237 nm<sup>2</sup> et 0,243 nm<sup>2</sup> avec l'hydrotalcite et l'hydrotalcite-dendrimère.

Une autre étude a été réalisée sur la formation de  $[\text{Mg-Al-CO}_3]$  à l'interface air/eau : l'originalité ici n'est pas en premier lieu d'utiliser l'agent texturant mais de réaliser une précipitation flash et la formation du film à l'interface air-eau simultanément. Le principal but de cette étude est de préparer des hydroxydes doubles lamellaires de morphologie fine et large et d'épaisseur uniforme en un temps très court et de les transférer sur un substrat afin de les utiliser comme film modificateur d'électrode ou capteur. Une monocouche de stéarate agissant comme agent de texture est formé à la surface d'une solution contenant du nitrate de magnésium et du nitrate d'aluminium ajustée à pH=10.5 par la soude. La formation d'HDL a été réalisée suivant deux méthodes. La première consiste à laisser se former le film pendant 6 heures à 0 mN/m puis de le comprimer jusqu'à 20mN/m avant de le déposer sur un substrat. La deuxième méthode, quant à elle, comprime le film 30 minutes après l'injection à une aire comprise entre 0,4 et 0,2 nm<sup>2</sup>/molécule. Le film se forme pendant 6 heures puis est comprimé à nouveau jusqu'à 20mN/m. Les diffractogrammes des rayons X des couches mettent en évidence la formation d'une phase HDL carbonatée  $[\text{Mg}_R\text{-Al-CO}_3]$  (distance interlamellaire de 0,78 nm), les ions carbonates provenant d'une contamination atmosphérique L'aire

<sup>22</sup> J. X. He, K. Kobayashi, Y. M. Chen, G. Villemure, A. Yamagashi, *Electrochemistry Communications*, 3, 2001, 473-477

<sup>23</sup> J. X. He, K. Kobayashi, M. Takahashi, G. Villemure, A. Yamagashi, *Thin Solid Films*, 397, 2001, 255-265

<sup>24</sup> J. X. He, S. Yamashita, W. Jones, A. Yamagashi, *Langmuir*, 18, 2002, 1580-1586

<sup>25</sup> A. S. Costa, T. Imae, *Langmuir*, 20, 2004, 8865-8869

moléculaire ( $0,36 \text{ nm}^2$ ) obtenue ainsi que les analyses chimiques confirment la formation de phase avec un rapport  $\text{Mg/Al} = 3$ .

Après l'étude concernant la formation de films HDL-molécules amphiphiles, ces derniers sont transférés sur un support. Une des techniques de caractérisations de dépôts la plus souvent utilisée est la microscopie à force atomique. Ce paragraphe concerne les observations des différents films étudiés ci-dessus lors de leur transfert. Les images AFM montrent la formation d'un film mixte présentant des particules d'HDL parsemées uniformément à la surface.

Les films de  $[\text{Ni}_3\text{-Al-Cl}]$  et  $[\text{Mg}_3\text{-Al-Cl}]^{22,23}$  sont déposés à la surface d'une électrode ITO ou de mica. L'épaisseur des particules  $[\text{Ni}_3\text{-Al-Cl}]$  a été mesurée à  $5 \pm 2 \text{ nm}$ , correspondant à un empilement de 7 -10 feuillets brucitiques et leurs tailles étaient comprises entre 50 et 250 nm. En augmentant la pression du film, la quantité d'HDL transférée sur le support est améliorée. Les clichés AFM des films  $[\text{Mg-Al-Cl}]$  montre une épaisseur comprise entre 20 à 50 nm (7 à 70 feuillets de type brucite). Les films de  $[\text{Ni}_3\text{-Al-Cl}]$  présentent des particules plus petites avec une dispersion plus homogène à la surface du mica.

Mais pour la même phase, il est possible de jouer sur la taille des particules et des domaines de transfert<sup>24</sup>. Lors de la préparation in-situ de la phase  $[\text{Mg-Al}]$ , la microscopie à force atomique suggère la formation de particules plus petites ( $0,2 - 3 \mu\text{m}$ ) dans le cas de la première méthode et de particules larges et fines ( $3 - 10 \mu\text{m}$ ) lors de la précipitation d'HDL à l'interface air/eau recouvrant par conséquence un plus large domaine.

Les images AFM<sup>25</sup> ont révélé la formation de domaines de plateaux avec une différence de hauteur de 6 nm pour les hydrotalcites et de 12 nm pour les nanocomposites indiquant l'intercalation et la présence de dendrimères adsorbés à la surface des nanocomposites. La Figure 8 illustre la formation des films mixtes  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COO}^-$  -  $[\text{Mg}_{4,5}\text{Al}_2(\text{OH})_{13}\text{Dendrimère}]$

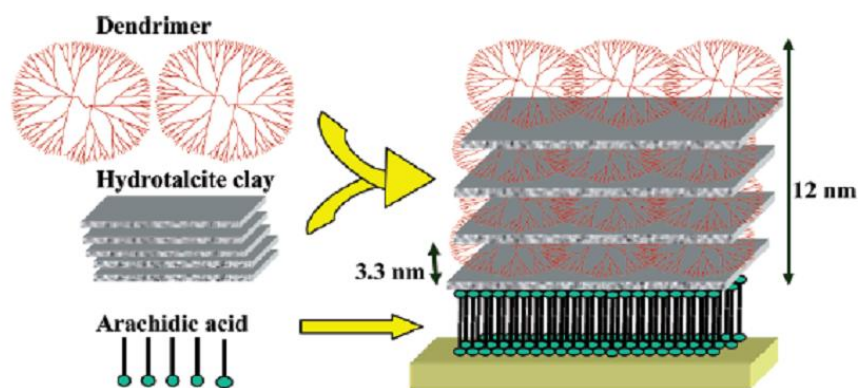


Figure 8 : Illustration des films mixtes  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COO}^- - ([\text{Mg}_{4.5}\text{Al}_2(\text{OH})_{13}\text{Dendrimère}])^{25}$

Récemment, il a été montré que les métaux de transition tels que Ni(II), Co(II) et Mn(III) incorporés dans les HDL agissaient comme des activateurs redox. Quand ces matériaux sont utilisés, ils agissent comme modificateurs d'électrode, et rehaussent la vitesse de transfert d'électrons entre le substrat conducteur et l'ion intercalé. L'étude en voltamétrie cyclique de l'électrode ITO ou de mica modifié par la matrice  $[\text{Ni}_3\text{-Al-Cl}]$  indique que  $\text{Ni}^{2+}$  agit comme un médiateur<sup>22, 23</sup> dans l'oxydation du mononucléide de guanosine 5'monophosphate (GPM) ou du  $[\text{Ru}(\text{CN})_4\text{L}]^{2-}$  en  $[\text{Ru}(\text{CN})_4\text{L}]^-$ .

## IV Protocole expérimental

Le travail effectué comporte deux parties. Dans un premier temps, nous avons étudié la formation de films « monomoléculaires » hybrides acide béhénique/HDL ou acide béhénique-HDL-uréase puis nous nous sommes intéressés au transfert de ces monocouches hybrides sur différents supports d'or et de nitrure de silicium. Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire d'Ingénierie et Fonctionnalisation des Surfaces à l'Ecole Centrale de Lyon sous la direction de Mme N. Jaffrezic-Renault.

### IV.1 Préparation des différents films

#### IV.1.1 Préparation de films acide béhénique/ $[\text{Zn-Al-HDL}]$

Plusieurs suspensions d'Hydroxyde Double Lamellaire  $[\text{Zn}_R\text{-Al-Cl}]$  (où  $R = 2, 3$ ) de concentrations différentes ont été préalablement préparées par agitation pendant une semaine, sous atmosphère inerte.

Les hydroxydes doubles lamellaires sont des composés chargés positivement, il est donc nécessaire d'utiliser un amphiphile anionique. Notre choix s'est porté sur l'acide béhénique (BA, acide docosanoïque) de formule  $(CH_3(CH_2)_{20}COOH)$  dont le pKa est égal à 5,6.

Le protocole utilisé est le suivant : 40  $\mu$ l d'acide béhénique à 1 mg/ml dissous dans du chloroforme a été déposé sur 200 ml d'une solution d'eau pure thermostatée à 20°C. contenant les particules d'argile. Afin d'élaborer un film stable, différents paramètres tels que la durée d'adsorption (15 min, une nuit), le pH (6,5 et 7,6), la concentration d'HDL (10, 50 et 100 mg/L) et la densité de charge ( $R=2, 3$ ) ont été étudiés. La Figure 9 représente l'appareil utilisé pour l'élaboration de film LB (annexe 4).

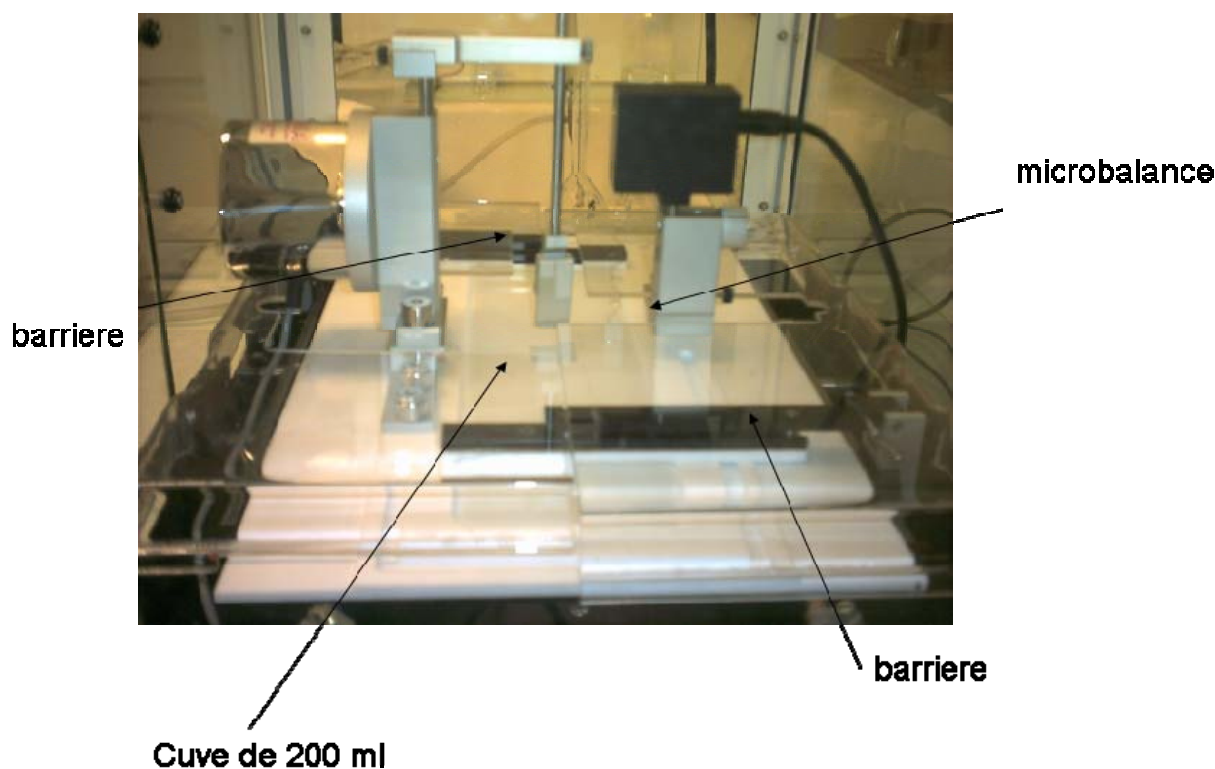


Figure 9 : Photo de l'appareil Langmuir - Blodgett utilisé au laboratoire D'Ingénierie et Fonctionnalisation des Surfaces (Ecole centrale Lyon)

#### IV.1.2 Préparation de films acide béhénique/ $Zn-Al$ -HDL/uréase

Les solutions mixtes d'enzyme-HDL ont été agitées pendant deux heures avant l'expérience afin de favoriser l'adsorption de l'uréase avec l'argile. La préparation d'un film acide béhénique- $[Zn-Al]$ -uréase se fait dans les mêmes conditions que précédemment. 40  $\mu$ l d'acide



béhénique dissous dans du chloroforme est répandu sur 200 ml d'une solution mixte contenant les particules d'HDL et l'urée à un pH égal à 7.6 par ajout de soude et à 20°C. Les paramètres étudiés pour la formation de tels films sont : rapport enzyme/HDL et la durée d'adsorption.

Une autre étude a été réalisée sur des matrices  $[Zn-Al-Urée]$  préalablement préparées par coprécipitation.

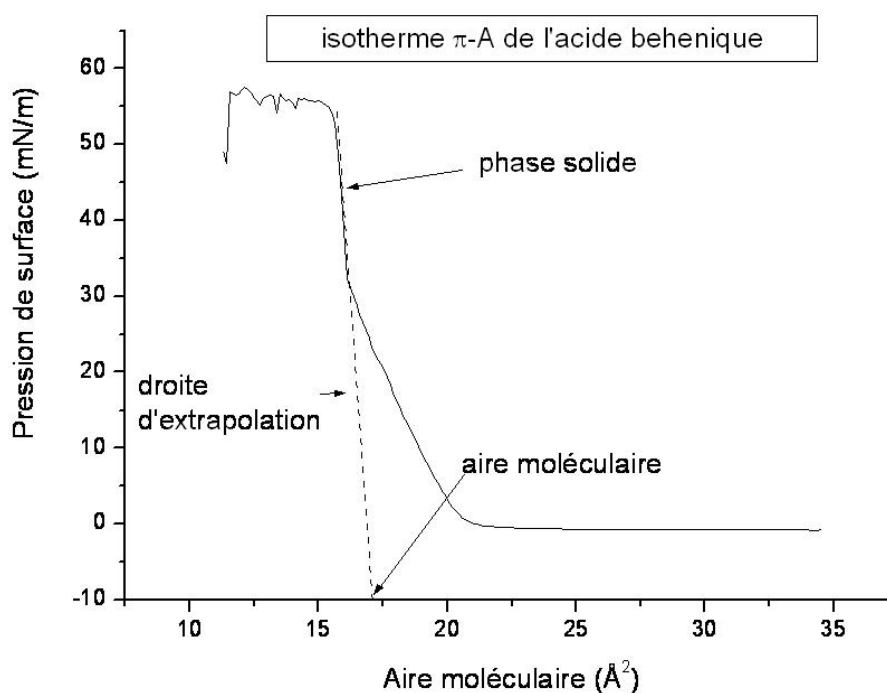
## IV.2 Résultats et discussion

### IV.2.1 Isothermes pression- aire des différents films LB

#### IV.2.1.1 Etudes préliminaires

La formation des films monomoléculaires à l'interface air/eau est étudiée au moyen de l'enregistrement des isothermes Pression – Surface,  $\pi - A$ . La pression de surface a été enregistrée en fonction de la variation d'aire moléculaire lors de la compression du film à une vitesse de 5 cm<sup>2</sup>/min.

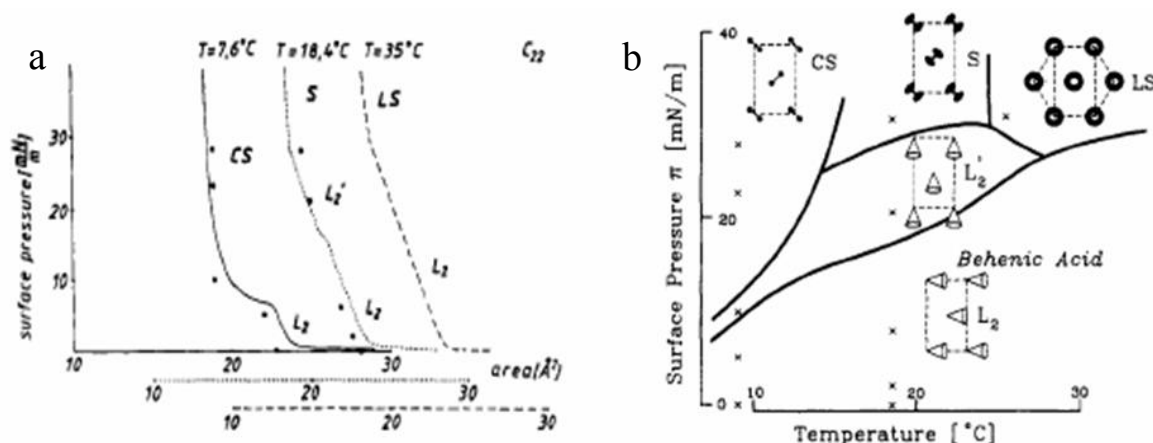
Pour pouvoir déterminer l'influence de l'auto-assemblage HDL-BA ou HDL- Urée-BA sur la formation des monocouches, nous avons enregistré préalablement l'isotherme de référence correspondant à la formation d'un film monomoléculaire d'acide behénique à la surface d'une solution d'eau pure (Figure 10).



**Figure 10 : Isotherme  $\pi$ -A de l'acide béhenique**

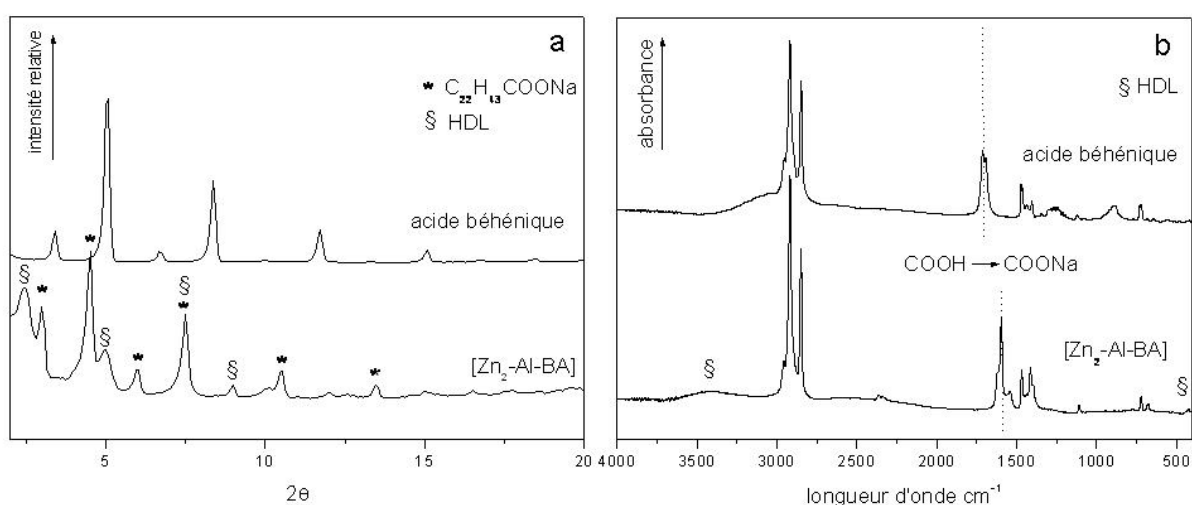
L'isotherme représente le comportement du film comprimé après évaporation du chloroforme. L'allure révèle une phase solide bien distincte caractérisant un film homogène de molécules amphiphiles orientées verticalement. Dès l'obtention de la courbe, il est possible de déterminer l'aire moléculaire du film par extrapolation de la partie de l'isotherme représentative de la phase solide jusqu'à  $\pi = 0$ . Cette droite coupe l'axe des abscisses à une valeur qui est définie comme étant l'aire moléculaire intrinsèque en absence de contrainte, notée A. Les valeurs seront extraites par linéarisation de la portion de courbe et extrapolation à l'axe des x. Pour un film compact de molécules de BA, l'aire moléculaire est de  $17,0 \text{ \AA}^2$ . Lorsque la pression de surface atteint  $55,0 \text{ mN/m}$ , le film se rompt.

Cependant, il est à noter que les isothermes  $\pi$ -A des molécules amphiphiles montrent des comportements différents en fonction de la température. Les films moléculaires de molécules amphiphiles formés à l'interface air-eau sont des systèmes 2D. En fonction de la pression et de la température, ils présentent différents polymorphismes. La Figure 11 schématise les isothermes pression-aire et les diagrammes de phases obtenus.

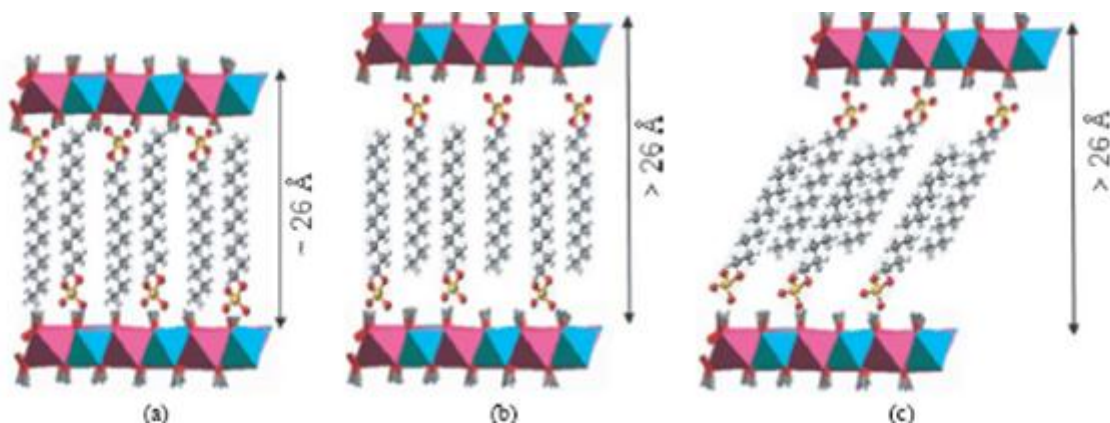
**Figure 11 : Représentation a) des isothermes  $\pi$ -A et b) diagrammes de phases des films BA en fonction de la température et de la pression de surface**

Les isothermes  $\pi$  - A enregistrés pour l'ensemble des systèmes hybrides HDL-BA présentent une nette modification de leur allure par rapport à l'isotherme de référence de l'acide béhenique. Cela indique que le film formé est structuralement différent et montre clairement la formation de monocouches hybrides HDL- BA.

Afin d'évaluer la possibilité de former des phases hybrides HDL-BA, nous avons étudié préalablement la formation de ces phases par coprécipitation. Les diffractogrammes des rayons X des phases préparées sont sans ambiguïté (Figure 12). Ils montrent la présence d'une phase HDL présentant une distance interlamellaire de 34,7 Å caractéristique d'un composé intercalé par le béhénate. De plus, avec une longueur de chaîne carbonée de 29,2 Å, l'anion de l'acide béhénique pourrait être soit orienté en monocouche compacte perpendiculairement aux feuillets soit en bicouches interdigitées, penchées par rapport aux feuillets. La structure (Figure 13) serait analogue à celle des phases HDL intercalées par l'anion dodécylsulfate ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^-$ ),  $[\text{Zn-Al-DDS}]^{26}$ .



**Figure 12 : a) Diffractogrammes X et b) Spectres infrarouge de l'acide béhénique et de la phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al-BA}]$**



**Figure 13 : Arrangement schématique du dodécylsulfate dans les hydroxydes doubles lamellaires a) monocouche perpendiculaire et b) et c) bicouches interpénétrées (pas à l'échelle)**

<sup>26</sup> H. Zhao, K.L. Nagy, J. Colloid and Interface Science, 274, 2004, 613-624

L'étude spectroscopique confirme la formation de la phase HDL hybride caractérisée par les bandes de vibration à  $3413\text{ cm}^{-1}$  et à  $427\text{ cm}^{-1}$  (M-O) et celles beaucoup plus intenses de l'anion BA, adsorbé en large excès à la surface des particules, comme l'indique le diffractogramme (Figure 12.b).

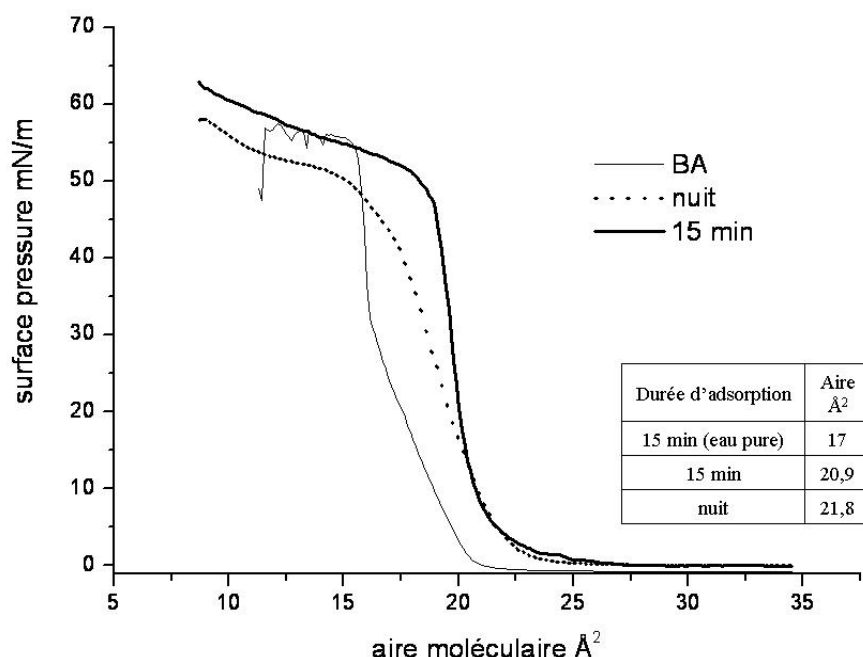
L'assemblage de feuillets HDL et de films monomoléculaires d'acide béhénique est favorisé par deux paramètres. Le premier facteur est la compensation de charge anion/cation qui conduit à un échange d'ion par le BA. Le deuxième effet positif provient de la commensurabilité des deux sous-réseaux hexagonaux feuillet HDL et monocouche de BA. En effet, dans le cas de feuillets HDL de densité de charge maximum à  $Zn^{2+}/Al^{3+} = 2,0$  l'aire disponible par anion monovalent vaut  $24,6\text{ Å}^2$ . La section moyenne<sup>27</sup> d'une chaîne trans  $C_{22}H_{43}COO^-$  est proche de  $19\text{ Å}^2$ . Une telle compatibilité structurale ne peut conduire qu'à un auto-assemblage efficace et souligne la forte faisabilité du projet développé.

#### IV.2.1.2 Etude de la formation de films LB dans le système binaire $[Zn-Al]$ -BA

Dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer la durée et le pH afin d'établir l'équilibre d'adsorption-désorption de l'argile sous la monocouche d'amphiphiles anioniques.

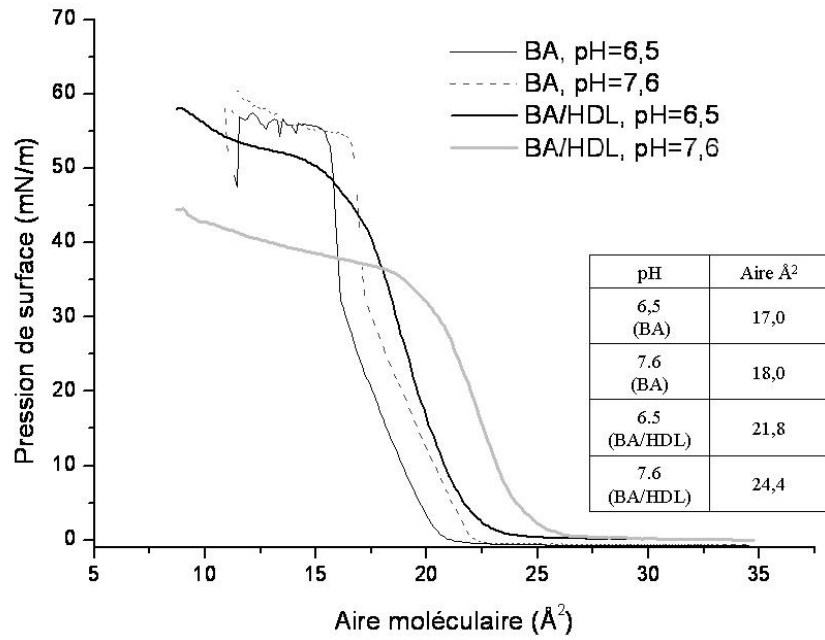
*Effet du temps d'équilibre initial* : La Figure 14 présente les isothermes pour des suspensions de  $100\text{ mg/L}$  de  $[Zn_3-Al-Cl]$  à un pH de 6,5. Ils ont été enregistrés à différents temps d'équilibre: le premier film a été comprimé au bout de 15 minutes durée nécessaire à l'évaporation du chloroforme et le second au bout d'une nuit. Dès la mise en contact de l'acide béhénique avec une suspension d'argile, le film mixte est formé. Cependant, après une nuit, l'aire moléculaire intrinsèque est supérieure. La quantité d'argile à la surface semble augmenter provoquant la formation d'un film plus dense qui présente une pression de rupture des films légèrement plus faible que le film formé instantanément.

<sup>27</sup> R.M. Kenn, C. Böhm, A. M. Bibo, I.R. Peterson, H. Möhwald, J. Physical Chemistry, 95, 1991, 2092-2097



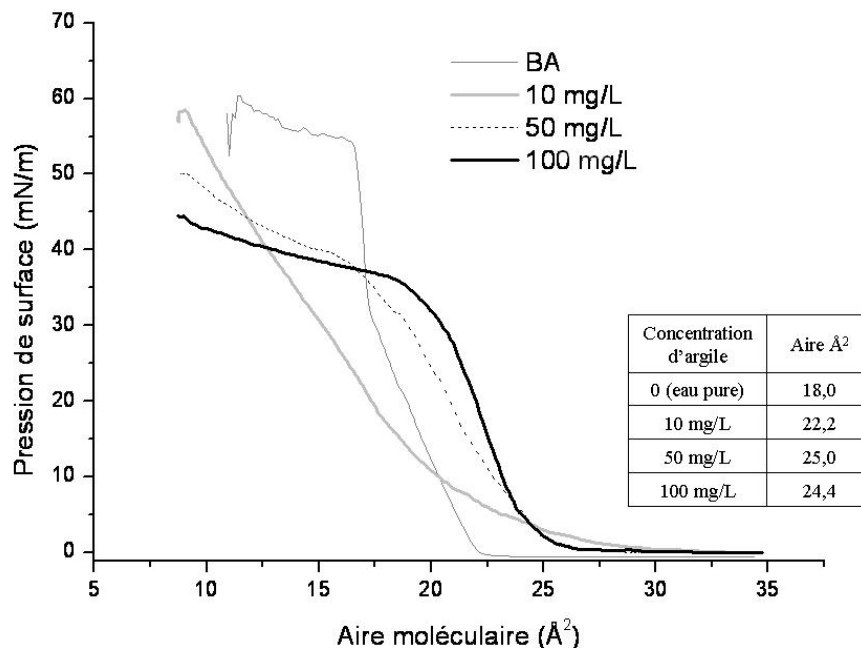
**Figure 14 : Isothermes  $\pi$ -A pour différentes durée d'adsorption d'hydroxydes doubles lamellaires  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  ainsi que l'isotherme de référence et Tableau récapitulatif des aires moléculaires**

*Effet du pH* : La structuration de l'interface associant anions béhénates et feuillets hydroxylés cationiques peut-être fortement influencée par la présence d'ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  qui peuvent limiter ou contracter l'auto-assemblage en assurant le rôle de pont entre les têtes polaires de l'amphiphile ou en ayant un rôle d'ion compétitif, par exemple. Nous avons donc enregistré, pour des suspensions de  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  de concentrations égales à 100 mg/L, les isothermes  $\pi$ -A pour 2 valeurs différentes de pH au-dessus de la valeur du  $\text{pK}_a$  (5,6) de l'acide béhénique, soit  $\text{pH} = 6,5$  et  $\text{pH} = 7,6$  (Figure 15). On remarque, qu'effectivement le pH influence la structuration de la monocouche d'acide béhénique puisque l'aire moléculaire augmente de  $17,0 \text{ \AA}^2$  à  $18,0 \text{ \AA}^2$  par ajout de soude. En effet en augmentant le pH, le pourcentage d'acide béhénique dissocié augmente (99% contre 89% pour  $\text{pH} = 7,6$  et  $\text{pH} = 6,5$  respectivement) ce qui génère une répulsion moyenne entre les têtes négatives plus grande. Si l'on compare les isothermes d'HDL, une nette différence apparaît. Pour un film formé à un pH de 7,6, l'aire moléculaire ( $24,4 \text{ \AA}^2$ ) est supérieure à celle déterminée pour un pH plus faible ( $21,8 \text{ \AA}^2$ ). Les interactions argile – surfactant sont favorisées à pH plus élevé et entraînent la formation d'un film plus dense. La nature hybride de la monocouche formée est aussi mise en évidence par une diminution de la pression de rupture.



**Figure 15 : Isothermes  $\pi$ -A pour différents pH de solution de BA et d'hydroxydes doubles lamellaires**  
Tableau récapitulatif des aires moléculaires

*Effet de la concentration en HDL :* Si la concentration d'argile en suspension est élevée, la densité de la sous-phase augmente et la quantité d'HDL près de la surface devient plus importante. L'adsorption de feuillets HDL à la surface devrait alors augmenter nettement et modifier l'aire moléculaire relative au film hybride. L'effet de différentes concentrations de  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  et  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  allant de 10 à 100 mg/L a été étudié (Figure 16 et 17).



**Figure 16 : Isothermes  $\pi$ -A pour différentes concentrations d'hydroxydes doubles lamellaires  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  ainsi que l'isotherme de référence. Tableau récapitulatif des aires moléculaires**

L'augmentation de la concentration d'argile favorise l'assemblage  $[Zn_3-Al-Cl]$ -BA, conduisant à une aire moléculaire plus élevée (Figure 16). En outre, cette augmentation de particules entraîne la cassure du film à des pressions plus faibles. Pour des concentrations de 50 et 100 mg/L d'argile, le comportement des films est proche. Ce phénomène peut s'expliquer par la saturation de l'interface eau-BA par les feuillets minéraux. Cependant, la pente obtenue à 100 mg/L est plus marquée indiquant que le film solide formé est plus rigide.

Pour les hydroxydes doubles lamellaires de type  $[Zn_2-Al-Cl]$ , les résultats entre 10 et 100 mg/L sont presque similaires (Figure 17). Cependant, la pente  $\pi/A$  plus marquée pour des films réalisés pour des suspensions d'argile de concentrations élevées suggère la formation d'un film plus dense.

La surface spécifique théorique d'un feuillet  $[Zn_2-Al-Cl]$  peut-être facilement évaluée par un calcul théorique :

$$2x \frac{Nx(a^2 \sqrt{3}/2)}{M(Zn_{0.66}Al_{0.33}(OH)_2Cl_{0.33} \cdot 0.66H_2O)} = 2x \frac{6,02 \cdot 10^{23} \cdot x[(3,08 \cdot 10^{-10})^2 \sqrt{3}/2]}{109,65} = 2x \frac{49,46 \cdot 10^3}{109,65} = 2x451 = 902 m^2 / g$$

A l'interface, l'adsorption de feuillets d'HDL met en jeu uniquement 50% de la surface (c'est-à-dire une seule face de feuillet) soit 451 m<sup>2</sup>/g. L'aire de la cuve est égale à 0,3 x 0,1 = 0,03 m<sup>2</sup>. Donc la masse de feuillets nécessaire pour couvrir toute l'interface est donc 0,03/451 = 0,06 mg/Volume total de la cuve = 0,06mg/200mL = 0,3 mg/L. Si la délamination n'est pas totale (ce qui est probable) on peut estimer une dispersion de plaquettes d'environ 10 feuillets empilés (épaisseur = 10 x 0,77 = 7,7 nm, voir mesures AFM) il faudrait donc 10 fois plus de masse pour couvrir la surface soit 3 mg/L. On voit que dans tous les cas avec une suspension à 10mg/L ou 100mg/L on a suffisamment de plaquettes pour couvrir 100% de la surface (ce qui n'est que théorique parce qu'il est impensable d'obtenir une couverture si idéale).

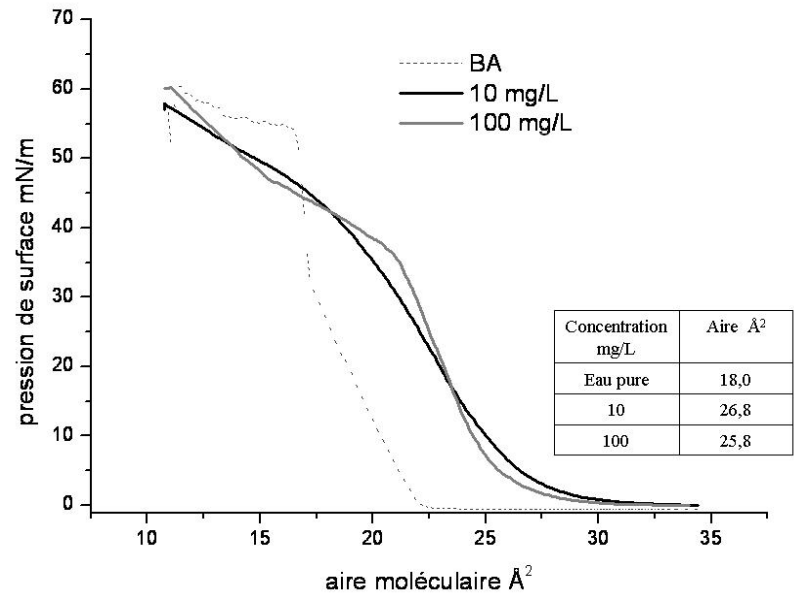


Figure 17 : Isothermes  $\pi$ -A pour différentes concentrations d'hydroxydes doubles lamellaires  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  ainsi que l'isotherme de référence. Tableau récapitulatif des aires moléculaires

*Effet de la densité de charge des feuillets HDL :* La Figure 18 présente les isothermes enregistrés lors de la compression de films mixtes formés au bout d'une nuit pour des solutions de  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  et de  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  de concentrations égales à 100mg/L et de pH égal à 7.6.

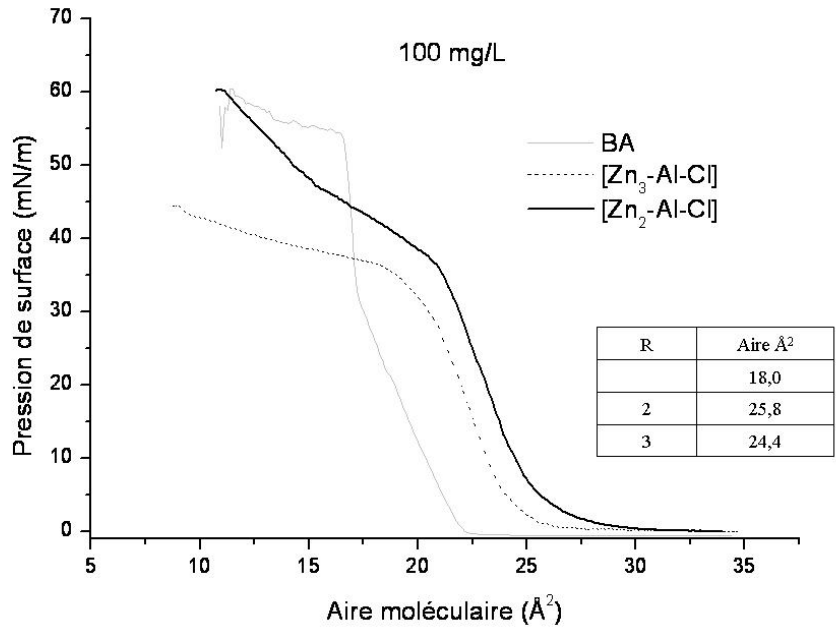
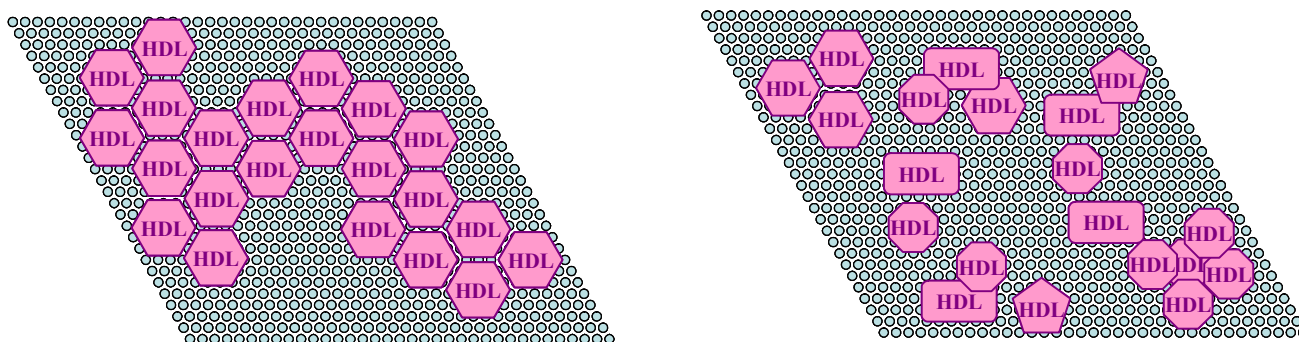


Figure 18 : Isothermes  $\pi$ -A de films  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ -BA et  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$ -BA pour des suspensions en HDL à a) 50mg/L et b) 100mg/L. Tableau récapitulatif des aires moléculaires



Avec une pression de rupture de film plus élevée de 15 mN/m, on montre clairement que le film hybride (100mg/L)  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]$ -BA est beaucoup plus stable que le film hybride  $[\text{Zn}_3\text{-Al}]$ -BA. L'isotherme  $\pi$ -A pour le film hybride  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]$ -BA présente une aire moléculaire légèrement plus élevée ( $25,8 \text{ \AA}^2$ ) que celle du film hybride  $[\text{Zn}_3\text{-Al}]$ -BA ( $24,4 \text{ \AA}^2$ ).

La stabilité d'un film hybride HDL-BA dépend de plusieurs paramètres. Le film sera stable si l'adsorption de plaquettes d'HDL ne diminue pas la compacité du film monomoléculaire de BA. La morphologie et la granulométrie des plaquettes peuvent avoir un rôle destructurant important. En effet, si le pavage de la monocouche par les particules d'HDL n'est pas optimal, on a alors deux domaines : des zones constituées uniquement de monocouches de BA compacté et des zones de films hybrides. L'interface entre ces zones peut créer des points de rupture de films. Le cas réel se situe entre le pavage idéal et l'absence de film hybride (Figure 19). Un taux de recouvrement idéal élevé favorisera la rigidité du film. Dans le cas de particules de morphologie très hétérogène on peut s'attendre donc à des ruptures de films à basse compression.



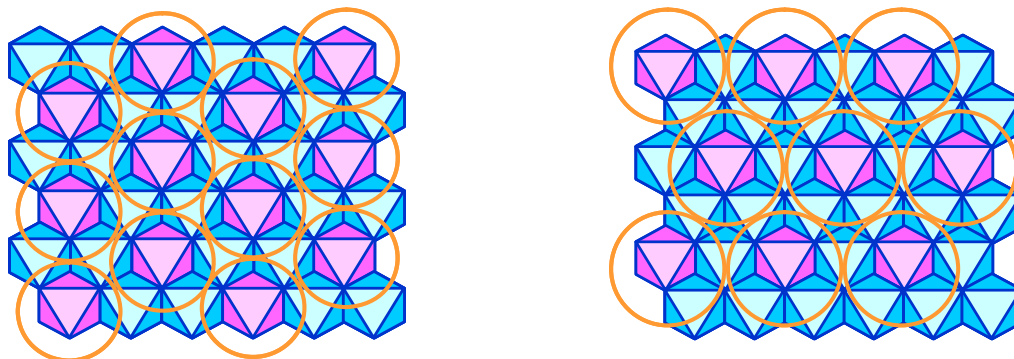
Auto-assemblage idéal de monocouches denses de BA et de feuillettes HDL.

Auto-assemblage imparfait de monocouche dense de BA et de feuillettes HDL de morphologie hétérogène.

**Figure 19 : Schéma de la formation de film mixte BA/HDL idéal et imparfait**

L'intensité des interactions entre BA et feuillettes HDL est un deuxième facteur majeur de la stabilité des films hybrides. Ces interactions sont d'autant plus stabilisantes qu'elles ne perturbent pas la nanostructuration en couches empilées. Avec des densités de charge des feuillettes élevées, les HDL sont des structures lamellaires idéales pour former des films multicouches. En effet, les films denses de BA possèdent une densité de charge de  $5,55 \text{ e/nm}^2$ , calculée à partir de l'aire moléculaire ( $18 \text{ \AA}^2$ ) obtenue sur l'isotherme  $\pi$ -A, proche de celles des feuillettes HDL  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]$  ( $4,16 \text{ e/nm}^2$ ) et  $[\text{Zn}_3\text{-Al}]$  ( $3,19 \text{ e/nm}^2$ ), les feuillettes  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]$

présentant la meilleure compatibilité de charge. On s'attend donc à un auto-assemblage plus stable dans ce cas avec une diminution de la compacité de la couche de BA moins importante (Figure 20).



Auto-assemblage d'un feuillet  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]^+$  et d'une monocouche de BA ( $A = 18 \text{ \AA}^2$ ) projeté dans le plan ab. Auto-assemblage d'un feuillet  $[\text{Zn}_3\text{-Al}]^+$  et d'une monocouche de BA ( $A = 18 \text{ \AA}^2$ ) projeté dans le plan ab.

Surface disponible / unité de charge =  $24,6 \text{ \AA}^2$  Surface disponible / unité de charge =  $32,9 \text{ \AA}^2$

**Figure 20 : Auto-assemblage BA/HDL suivant la projection dans le plan ab de phases  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]$  et  $[\text{Zn}_3\text{-Al}]$**

La comparaison des isothermes pour les deux rapports Zn/Al et les deux concentrations confirment ces hypothèses. Quelle que soit la concentration de la suspension, pour un pH de 7,6, la stabilité du film est toujours supérieure pour la phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]$ . Pour ces phases, la formation d'une phase solide stable est confirmée par des pentes  $\pi/A$  élevées. Les valeurs des aires moléculaires expérimentales sont toujours comprises entre celle du BA ( $18,0 \text{ \AA}^2$ ) et celles attendues pour un film homogène hybride de  $[\text{Zn}_2\text{-Al}]$ -BA ou de  $[\text{Zn}_3\text{-Al}]$ -BA,  $24,6 \text{ \AA}^2$  et  $31,9 \text{ \AA}^2$  respectivement. Dans le cas de films imparfaits comme c'est probablement le cas, il est toutefois difficile de comparer les valeurs entre elles. Le film hybride le plus homogène est obtenu pour un rapport Zn/Al de 2 et un pH de sous-phase de 6,5 (Figure 21). Pour ce système, le film est plus stable qu'un film de BA pur ( $\Delta P = + 10 \text{ mN/m}$ ) et présente une aire moléculaire proche de celle attendue pour un film hybride pur,  $21,9 \text{ \AA}^2$  contre  $24,6 \text{ \AA}^2$ . Il est intéressant de noter que ces considérations structurales pour l'arrangement de films hybrides HDL-BA sont compatibles avec les diagrammes de phases proposés pour les monocouches de BA (Figure 11).

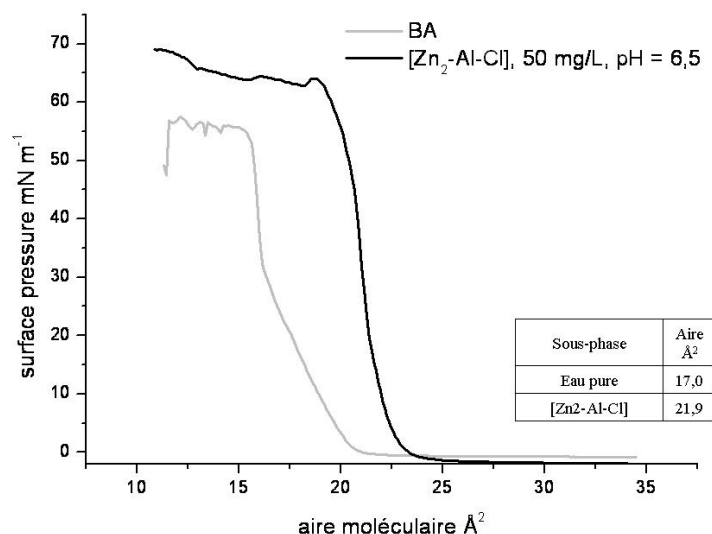


Figure 21 : Isotherme  $\pi$ -A de films  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]\text{-BA}$  à 50 mg/L et à pH = 6,5.

Tableau récapitulatif des aires moléculaires

#### IV.2.2 Etude de la formation de films LB dans le système ternaire $[\text{Zn-Al}]\text{-Urée-BA}$

L'étude précédente a montré la possibilité de former des films LB d'hydroxydes doubles lamellaires. Maintenant, nous allons nous intéresser à l'élaboration de films LB dans le système ternaire  $[\text{Zn-Al}]\text{-Urée-BA}$ . Deux méthodes ont été utilisées, l'adsorption conjointe d'urée et d'HDL sur une monocouche de BA et l'adsorption de phases hybrides  $[\text{Zn-Al-Urée}]$  coprécipitées sur la monocouche de BA. Le pH de la sous-phase est de 7,6.

La Figure 22 présente différents isothermes  $\pi$ -A obtenus pour des rapports massiques urée/HDL compris entre 1/3 et 2 et des temps d'équilibre de 4h30 à 1 nuit. Le Tableau 1 récapitule les conditions expérimentales et les aires moléculaires déterminées.

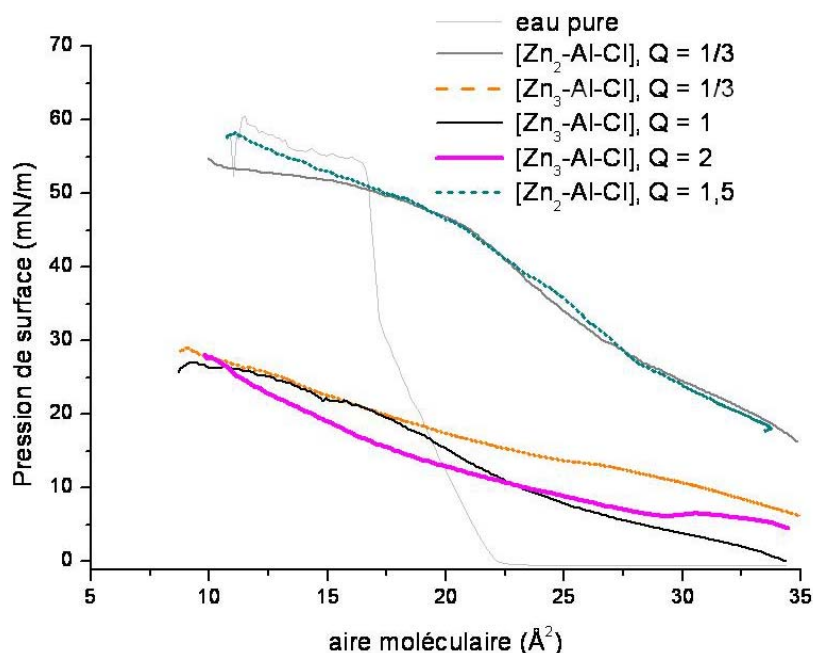


Figure 22 : Isothermes  $\pi$ -A des systèmes ternaires HDL-Uréase-BA ainsi que l'isotherme de référence

Tableau 1 : Conditions expérimentales et aires moléculaires

Echantillons	argile (mg/L)	Uréase (mg)	Uréase/HDL	durée	Aire Å²
BA	-	-	-	15 mn	18.0
$[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$	50	10	1	4h 30	29,3
$[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$	100	40	2	4h 30	36
$[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$	50	3,5	1/3	nuit	38,6
$[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$	10	3,5	1,75	nuit	37,8
$[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$	50	3,5	1/3	nuit	41,3

En comparant, les isothermes obtenus avec une suspension d'argile et d'uréase, on constate une nette différence d'allure par rapport aux isothermes de l'acide bédénique seul et des hydroxydes doubles lamellaires. En effet, l'aire moléculaire augmente fortement (+10 à +20 Å²) et la pression de rupture ne dépasse jamais 30mN/m dans le cas d'utilisation de phases  $[\text{Zn}_3\text{-Al}]$ . Cette modification suppose la formation d'un film HDL-Uréase-BA à l'interface eau/air. Dans les conditions de pH utilisé, l'uréase et l'acide bédénique sont sous leur forme anionique et peuvent donc interagir avec les particules chargées positivement d'HDL. L'adsorption de l'uréase à l'interface air-eau avant toute compression conduit à une augmentation de la pression de surface initiale, comparée à celle de l'HDL seul. Cette

augmentation de pression est provoquée par la formation d'un film plus dense et a été identifiée par Jaffrezic et coll<sup>16</sup> lors de l'adsorption d'uréase seule sur un film d'acide béhénique à  $\text{pH} = 5$ . Cette adsorption à l'interface air-eau est due aux propriétés amphotères de l'enzyme qui possède des zones de surfaces hydrophobes et d'autres hydrophiles. La durée d'adsorption influence l'aire moléculaire du film puisque le film obtenu à partir du rapport uréase/HDL = 1/ 3 après une nuit présente une aire moléculaire plus importante que le film avec  $Q=1$  compressé après 4h30 d'adsorption.

La Figure 22 met clairement en évidence l'effet de la densité de charge de la matrice HDL puisque pour les systèmes ternaires impliquant la matrice  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  les isothermes  $\pi$ -A sont nettement décalés vers les pressions de surface et les aires moléculaires plus élevées. Ces résultats confirment les conclusions précédentes quant à l'effet stabilisant de cette matrice HDL. Dans la gamme de concentrations d'uréase étudiée, ce paramètre ne semble pas avoir d'influence significative sur la formation du film LB. Cependant, pour la même quantité d'uréase, l'aire moléculaire augmente lorsque la concentration d'HDL est accrue. Cette observation montre la formation d'un film hybride uréase-HDL-BA et s'explique par les fortes propriétés d'adsorption des HDL pour l'uréase. Les caractérisations physico-chimiques des transferts de films sur supports plans confirment ces conclusions.

La structuration de films Langmuir-Blodgett pour le système binaire  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Uréase}]$ -BA avec ( $[\text{Zn}_3\text{-Al-Uréase}]$  = phase HDL coprécipitée ) a été étudiée. La Figure 23 compare les différentes expériences réalisées pour des rapports massiques uréase/HDL = 1/3 et 3 à 50 mg/L. Contrairement à l'étude précédente, l'uréase se trouve piégée dans la matrice inorganique. L'isotherme correspondant montre une allure comprise entre celle de l'isotherme d'un film HDL et celle de l'isotherme d'un film hybride uréase/HDL (par adsorption). La pression de surface ne s'élève pas dès le contact avec l'acide béhénique. Cependant, la compression du film entraîne directement l'élévation de la pression de surface. En augmentant la concentration d'uréase immobilisée, le film aura tendance à se rapprocher du film élaboré par adsorption. En effet, on observe, dans ce cas, une augmentation continue (sans palier) de la pression de surface jusqu'à une valeur plus importante. La présence d'uréase favorise la formation d'un film dense soulignée par une aire moléculaire supérieure. En outre, la morphologie des phases influence le film formé puisque l'aire moléculaire déterminée pour une phase lyophilisée (  $23,0 \text{ \AA}^2$  ) est inférieure à celle déterminée pour une phase séchée à

température ambiante ( $29,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Cette modification peut être provoquée par la texture plus aérée, moins compacte des phases lyophilisées.

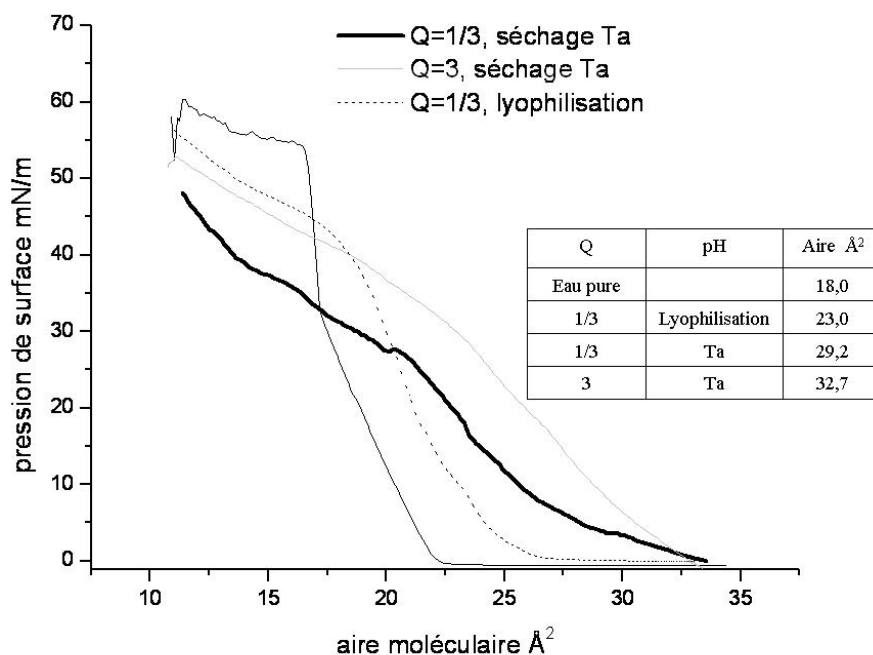


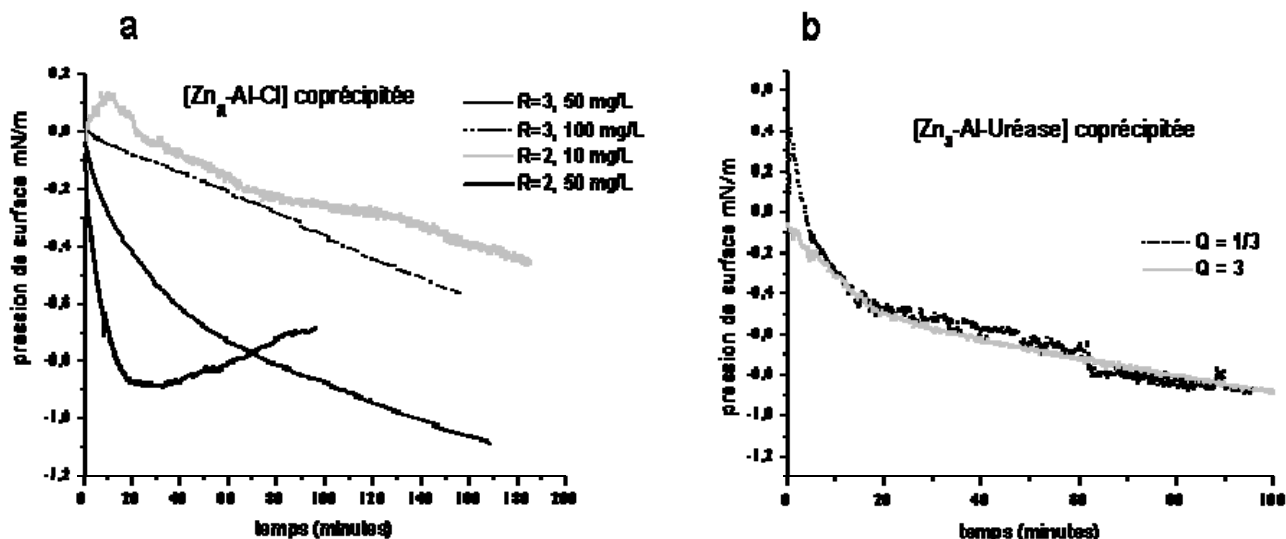
Figure 23 : Isothermes  $\pi$ -A pour  $[Zn_3-Al-urase]$  et l'isotherme de référence.

Tableau récapitulatif des aires moléculaires

#### IV.2.3 Isotherme pression temps d'équilibre.

L'isotherme pression de surface en fonction du temps permet d'étudier la cinétique d'adsorption des feuillettes d'HDL et de l'uréase à l'interface air-BA-eau. Une fois, la molécule amphiphile déposée sur la solution, on ajuste la pression de surface à 0 mN/m et l'aire moléculaire est maintenue. On regarde l'évolution de la pression en fonction du temps. Une fois le plateau atteint, le film formé est stable, et peut donc être comprimé.

Les isothermes  $\pi - t$  ont été enregistrés lors de la préparation de films  $[Zn_R-Al-Cl]$  avec  $R = 2$  et 3 et pour des concentrations à 100 mg/L et 50mg/L à pH=7.6, pendant une nuit. La Figure 24.a montre que la présence d'argile en suspension diminue légèrement la pression de surface.


 Figure 24 : Isothermes  $\pi$ -t des suspensions a)  $[\text{Zn}_R\text{-Al-Cl}]$  et b)  $[\text{Zn}_R\text{-Al-Uréase}]$ 

Ce phénomène s'explique par le fait que des grosses particules d'HDL tombent et entraînent avec elles des molécules d'amphiphiles diminuant ainsi la tension du film.

D'un point de vue cinétique, la vitesse de sédimentation d'une suspension de particules solides est donnée par la relation :

$$v = \frac{2r^2(d_s - d_{liq})g}{9\eta}$$

où  $r$  est le rayon moyen des particules,  $d_s$  et  $d_{liq}$  les densités du solide et du liquide respectivement,  $g$  l'accélération de la pesanteur et  $\eta$  la viscosité du milieu. On voit donc que la vitesse de sédimentation est inversement proportionnelle à la viscosité qui, elle, dépend de la concentration en particules, d'après la relation d'Einstein. Plus la concentration de la suspension sera élevée et plus la compétition entre adsorption de surface et sédimentation sera en faveur de l'adsorption. C'est effectivement l'observation que l'on fait, la pression de surface diminue plus faiblement lorsque la concentration d'HDL est supérieure. Cet effet compétitif est nettement visible, pour la phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ , dont l'isotherme  $\pi$ -t passe par un minimum pour croître ensuite au cours de la formation du film LB. Dans le cas des films hybrides  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Uréase}]\text{-BA}$ , dans lesquels l'uréase est préalablement confinée dans la matrice HDL, on observe le même phénomène quel que soit le taux de charge d'enzymes (Figure 24.b). Cette phase hybride présente les propriétés spécifiques d'un composé pur. Par contre pour le système ternaire HDL-uréase-BA, le comportement est inverse, la pression de surface augmente avec le temps (Figure 25). Les molécules d'enzyme viennent interagir avec

l'amphiphile formant alors un film plus dense. En outre, le changement de pression de surface varie avec la charge du matériau et la concentration d'uréase. En favorisant les interactions entre les trois composantes, la tension du film s'accroît. Pour une concentration de  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  de 50 mg/L, la pression de surface à  $t = 0$  passe de 5,5 à 13 mN/m pour un rapport uréase/HDL compris entre 1/3 et 3. D'après le chapitre 3, la capacité d'adsorption est de 315 mg/g pour  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  et 228 mg/g pour  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$ . Une suspension à 50 mg/L correspond pour le volume de la sous-phase (200 ml) à 10 mg d'HDL. Par conséquent, la quantité d'uréase adsorbée équivaut à 3,15 et 2,28 mg, respectivement. Pour un rapport  $Q=1$ , il reste de l'uréase libre en solution qui va interagir aussi pour former le film et augmenter la tension du film à  $t = 0$ . En outre, dans ce cas, le film semble déjà formé puisque la tension est peu modifiée avec le temps. Notons que le procédé d'adsorption est pratiquement complet après une heure et suggère la formation d'un film stable en présence d'uréase.

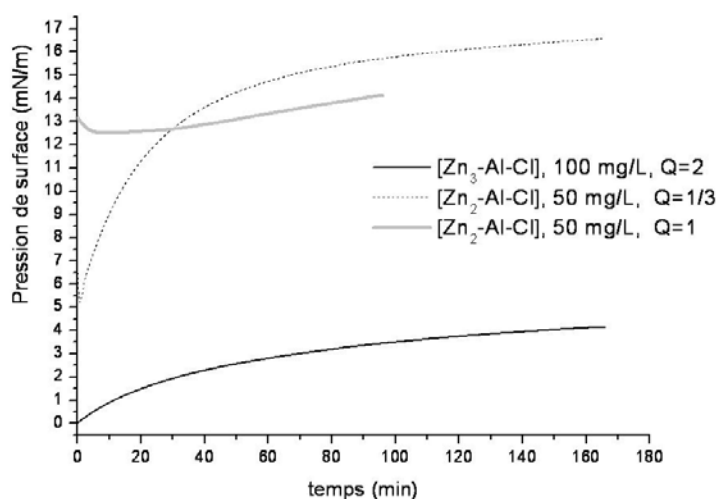


Figure 25 : Isothermes  $\pi$ - $t$  des suspensions d'hydroxydes doubles lamellaires et uréase

#### IV.2.4 Etude de la stabilité des films LB: les isobares aire – temps

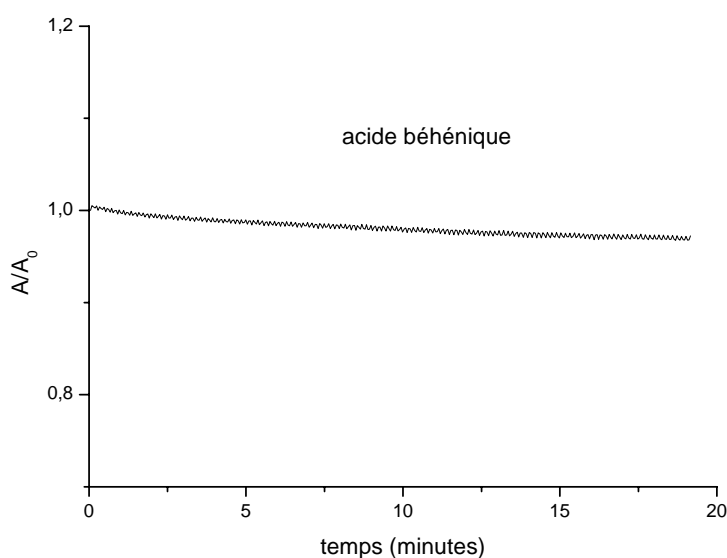
Avant de transférer le film à la pression déterminée, une étude sur la stabilité du film comprimé est réalisée.

Les isobares  $A - t$  consistent à observer l'évolution de l'aire moléculaire en fonction du temps  $t$  alors que la monocouche est maintenue à une pression constante. Ils permettent de contrôler la stabilité des films. Ainsi, si le film est instable, une diminution de l'aire moléculaire sera observée. Différents mécanismes sont possibles pour expliquer cette diminution : la



monocouche peut se réorganiser ou se dissoudre dans la sous-phase. Si le film se dissout lentement dans la sous-phase, l'aire moléculaire va décroître lentement de façon continue. La relaxation due à la réorganisation des molécules dans le film est caractérisée par une diminution initiale de l'aire moléculaire suivie d'une relaxation plus lente, l'aire tend vers une valeur constante.

L'isobare A-t de l'acide béhénique déposée à la surface d'une solution à  $\text{pH} = 7,6$  révèle une légère diminution continue de l'aire moléculaire indiquant que le film formé est stable (Figure 26).



**Figure 26 : Isobare A-t de l'acide béhénique**

Lors de la compression des films mixtes HDL-BA, l'aire moléculaire est maintenue indiquant que les films formés sont également stables (Figure 27). Cependant, l'aire moléculaire du film  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  à 100 mg/L diminue légèrement. Pour des concentrations élevées d'hydroxydes doubles lamellaires, il est possible qu'une légère quantité retourne en suspension ou recouvre les autres particules.

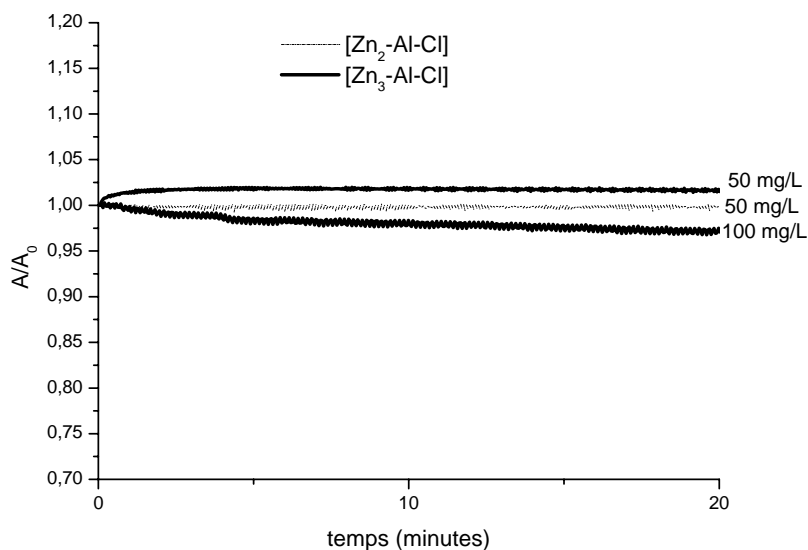


Figure 27 : Isobares A-t des films d'HDL

La présence d'enzyme révèle une diminution continue de l'aire moléculaire en fonction du temps indiquant que le film formé est moins stable (Figure 28). Cette instabilité est provoquée par la dissolution de l'enzyme dans la sous-phase. L'augmentation de la quantité d'urée entraîne toutefois la stabilisation du film formé. En effet, au début l'aire décroît puis se maintient au bout de 10 minutes alors que le film formé pour des concentrations plus faibles diminue continuellement. Cette observation a été montrée par Jaffrezic et coll<sup>14</sup> indiquant que les interactions entre l'acide béhénique et l'urée sont plus importantes. Par contre pour des films  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Urée}]$ , l'aire moléculaire se maintient suggérant la formation d'un film plus stable lorsque l'urée est piégée dans la matrice.

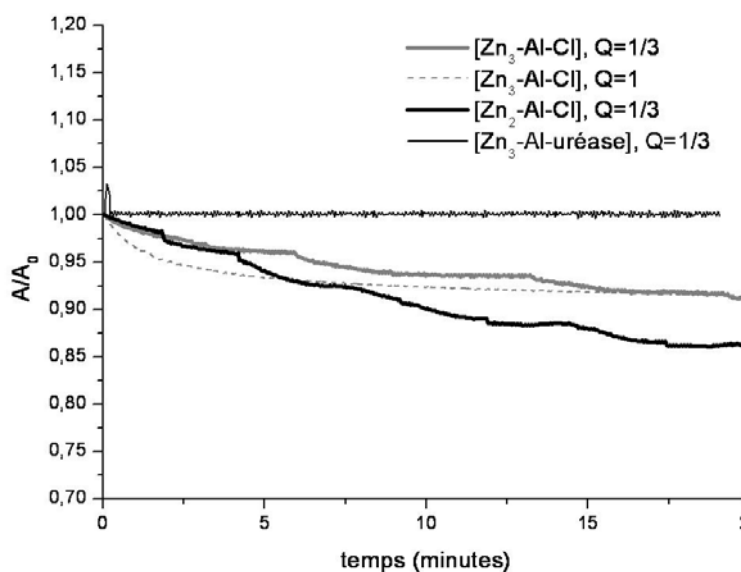


Figure 28 : Isobares A-T des films hybrides urée-HDL

### IV.3 Mise en œuvre des transferts de films LB sur substrats

#### IV.3.1 Etude du transfert

Le principe du transfert est le suivant : une fois le film formé et comprimé, le support est alors immergé dans la cuve tandis que la barrière mobile est asservie à une pression constante de manière à maintenir l'aire moléculaire (Figure 29). Une fois le film comprimé, le support est plongé verticalement dans la sous-phase à une vitesse de 5 mm/min et laissé pendant 100 secondes pour stabiliser le film formé. Ensuite, il est remonté à la même vitesse que précédemment et laissé à l'air pendant 200 secondes. Des dépôts successifs permettent d'empiler plusieurs couches monomoléculaires. L'organisation des films dépend de la nature des espèces et du support.

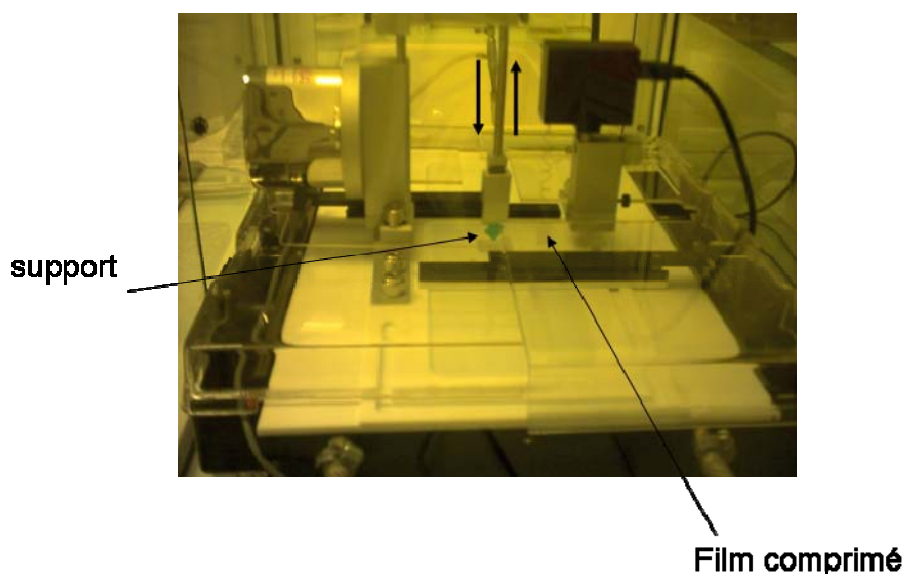


Figure 29 : Photo illustrant les conditions de transferts

Dans notre étude, les transferts ont été effectués, au bout de 4h30, après compression du film à 5 cm<sup>2</sup>/min jusqu'à une pression de surface déterminée préalablement. Le Tableau 2 résume les pressions de transfert ainsi que le type de support utilisé pour les dépôts (annexe 4). A noter que le transfert doit être réalisé dans la partie solide de l'isotherme. Cependant, dans notre cas, on ne distingue pas les différentes étapes de formation du film. Les pressions de

transferts ont donc été déterminées en fonction de la pression de rupture (qui ne doit pas être dépassée) et du début de l'augmentation de la tension du film.

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des conditions de transferts des films LB**

Phase	Concentration (mg/L)	pH	Urée/HDL Q	P° (mN/m)	Substrat	nature
$[Zn_3-Al-Cl]$	50	7,6	0	28	Au	hydrophobe
$[Zn_3-Al-Cl]$	100	7,6	0	28	Au	hydrophobe
$[Zn_3-Al-Cl]$	50	7,6	0	28	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_2-Al-Cl]$	10	7,6	0	40	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_2-Al-Cl]$	50	7,6	0	40	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_2-Al-Cl]$	100	7,6	0	40	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_2-Al-Cl]$	50	6,5	0	35	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_3-Al-Cl]$	50	7,6	1	25	Au	hydrophobe
$[Zn_3-Al-Cl]$	50	7,6	$\frac{1}{3}$ (3,5 mg)	28	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_2-Al-Cl]$	50	7,6	$\frac{1}{5}$ (2 mg)	30	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_2-Al-Cl]$	50	7,6	$\frac{1}{3}$ (3,5 mg)	35	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_2-Al-Cl]$	50	7,6	1 (10 mg)	38	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_2-Al-Cl]$	10	7,6	$\frac{1,75}{(3,5 \text{ mg})}$	32	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_3-Al-Cl]$ cop	50	7,6	$\frac{1}{3}$	32	$Si_3N_4$	hydrophile
$[Zn_3-Al-Cl]$ cop	50	7,6	3	36	$Si_3N_4$	hydrophile

#### IV.3.2 Quantification du transfert

Lors de l'immersion et l'émersion du support, une certaine quantité de BA, BA-HDL ou BA-Urée-HDL est déposée. Elle dépend des interactions entre la couche monomoléculaire à l'interface air-eau et la nature de la surface de substrat (hydrophile ou hydrophobe et de sa rugosité). Lors des différents passages, un taux de transfert est enregistré. Il traduit l'affinité des espèces formant le film avec le support. Si le taux est faible, le transfert n'est pas bon. Par contre, pour un dépôt idéal, le transfert sera alors de 100%. Nous avons donc enregistré le taux de transfert des différents systèmes étudiés pour évaluer leur affinité en fonction du support utilisé.

Le coefficient de transfert est une estimation de la qualité du transfert. Ce coefficient est défini comme le rapport de l'aire de la monocouche prélevée de la surface de l'eau (Al) à pression constante, calculée à partir du déplacement des barrières, sur l'aire du support immergé dans la phase aqueuse (As)

Les premiers transferts ont été réalisés sur des substrats en or de nature hydrophobe. Les coefficients de transfert négatifs ont montré que les films HDL-BA se déposaient difficilement (Figure 30). L'étude a donc été entreprise sur des supports en nitrure de silicium qui favorisent des coefficients de transfert plus importants (Figure 30).

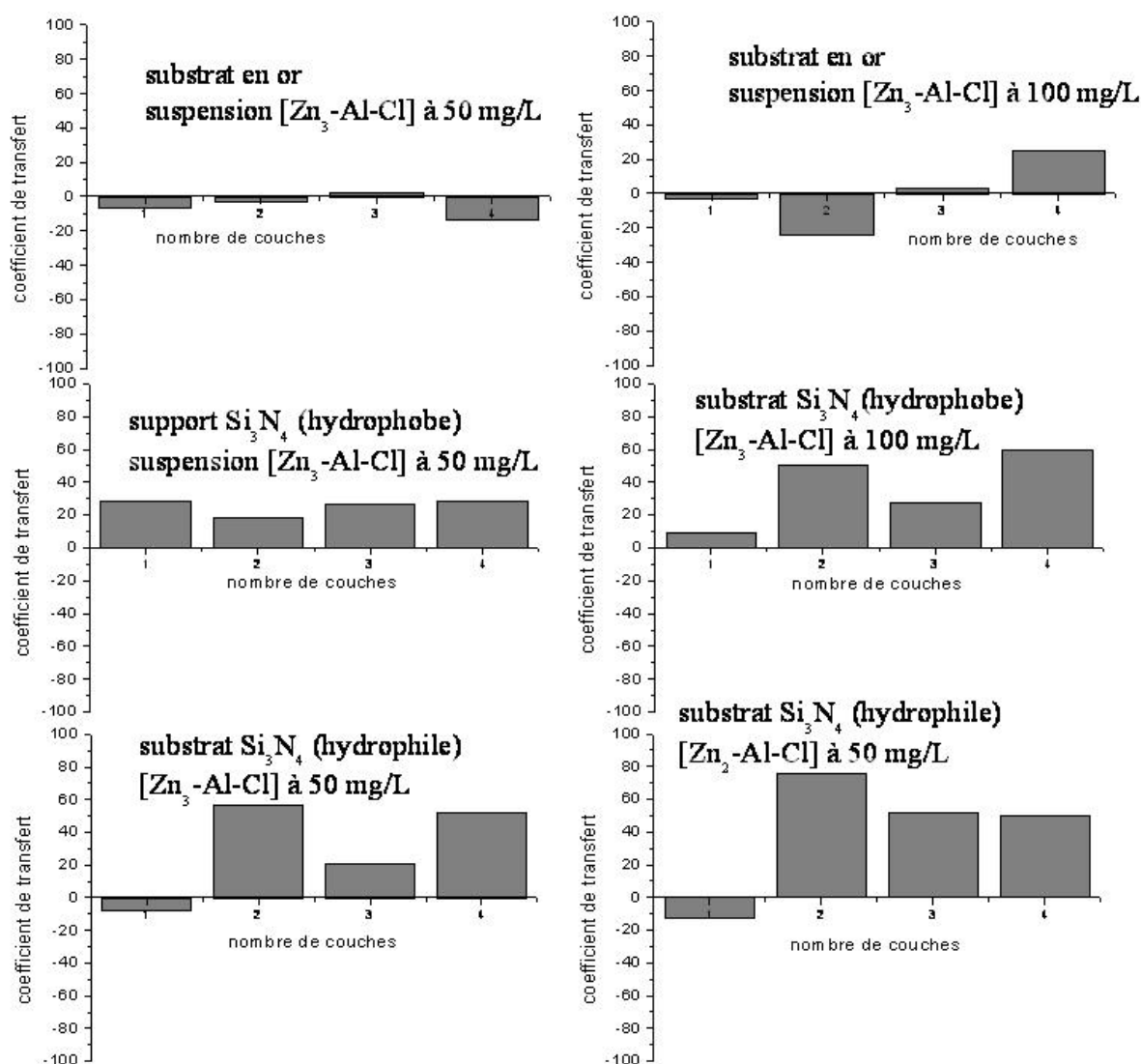


Figure 30 : Coefficients de transferts des films HDL

La quantité de film déposée est améliorée par la nature du support et par une augmentation de la concentration d'HDL en suspension. Les supports hydrophiles semblent être légèrement plus favorables au transfert des films hybrides. La valeur négative du coefficient de transfert lors de l'immersion du substrat hydrophile est provoquée par le fait que la chaîne carbonée ne puisse interagir avec la nature de la surface. La première monocouche est donc une couche d'HDL (Figure 31).

Dans le cas des transferts de films mixtes HDL-Uréase, les coefficients de transferts sont meilleurs pour un substrat en or, de l'ordre de 60 % contre 40 % pour les supports  $Si_3N_4$ . Cependant, il est à noter que la quantité d'uréase déposée sur le substrat en or est plus importante ( $Q=1$ ). Comme précédemment, la nature hydrophile engendre une amélioration de la quantité transférée. Il est à noter que le premier transfert du film  $[Zn_3-Al-Cl]$ -Uréase-HDL ( $Q=1/3$ ) sur le substrat hydrophile est positif ce qui suggère le transfert de la biomolécule. En effet, le caractère amphotère de l'enzyme permet son adhésion sur ce type de substrat.

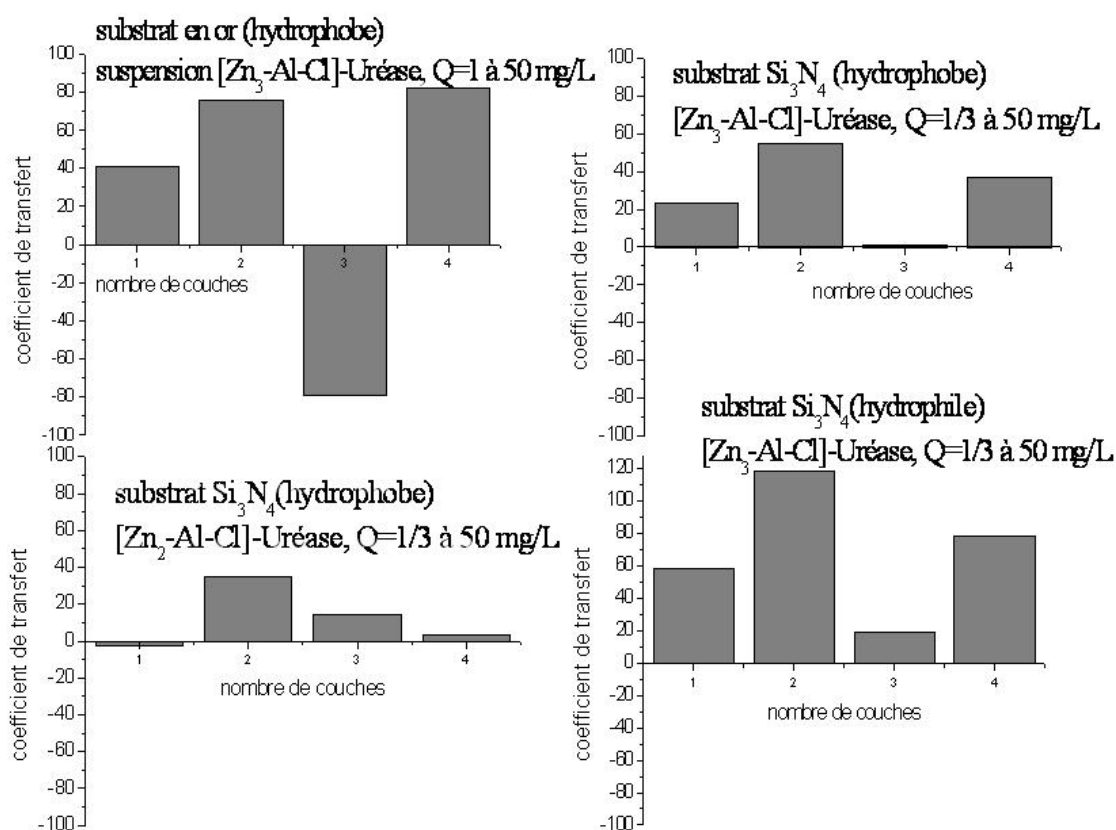


Figure 31 : Coefficients de transferts des films Urée-HDL

## V Caractérisations des films préparés

### V.1 Etude sur la mouillabilité des films déposés

Afin de confirmer le transfert, une étude sur la mouillabilité des différents films hybrides déposés sur substrat de nitrure de silicium hydrophile a été réalisée. Cette méthode permet de savoir si il y a une modification au niveau de la surface du support. Le principe consiste à déposer sur la surface du substrat une goutte d'eau et de mesurer l'angle de contact (annexe). Une surface avec un angle de contact inférieur à  $90^\circ$  est habituellement appelée hydrophile. Dans le cas où l'angle de contact est supérieur à  $90^\circ$ , la surface présente un caractère hydrophobe.

D'après la littérature, un film d'acide caprique ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ ) déposé sur un support  $\text{GaAs}^{28}$  augmente l'angle de contact de  $83^\circ$  à  $90^\circ$ . Une étude<sup>29</sup> sur la mouillabilité de surface solide modifié par déposition en phase vapeur d'acide stéarique ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ ) a montré des mesures d'angle de contact proche de  $100^\circ$ . Ils ont comparé cette valeur à celle déterminée ( $115^\circ$ ) pour des films d'acide stéarique préparés par la méthode LB. Ces valeurs montrent que le film déposé par PVD présente une structure de molécules amphiphiles hautement ordonnée.

La Figure 32 montre les mesures de mouillabilité (angle de contact) de différents substrats :

- support hydrophile,
- support modifié par le film HDL-BA,
- support modifié par le film HDL-Uréase-BA,
- support modifié par le film  $[\text{Zn-Al-Uréase}]$ -BA.

Lors de notre étude, le support  $\text{Si}_3\text{N}_4$  hydrophile présente un angle de contact de  $21^\circ$ . L'angle de contact augmente lors de transferts de phase HDL-BA et Urease-HDL-BA. Cette différence de mouillabilité confirme la présence d'un film à la surface du support.

Les supports modifiés par l'argile montrent un angle de  $103^\circ$  et  $120^\circ$  traduisant un caractère hydrophobe. Cette augmentation suggère que les feuillettes d'HDL sont transférés avec une

<sup>28</sup> J. Martz, L. Zupporili, F. Nuesch, Langmuir, 20, 2004, 11428-11432

<sup>29</sup> Y. L. Lee, Colloids and Surface A : Physicochemical and Engineering Aspects, 155, 1999, 221-229

couche de b  n  te, associés via leur tête polaire. La surface des particules oriente les chaînes carbonées hydrophobes de l'amphiphile vers l'extérieur.

Les supports modifiés par le système ternaire uréase/HDL/BA présentent un angle de contact plus faible ( $77^\circ$ ) caractéristique d'une surface faiblement hydrophile. Or, la présence de BA avec la tête polaire sur le substrat donne un caractère hydrophobe ( $> 90^\circ$ ). Cette observation suggère des zones d'uréase. Par contre, pour les phases  $[\text{Zn-Al-Uréase}]$ , le caractère hydrophobe est accentué.

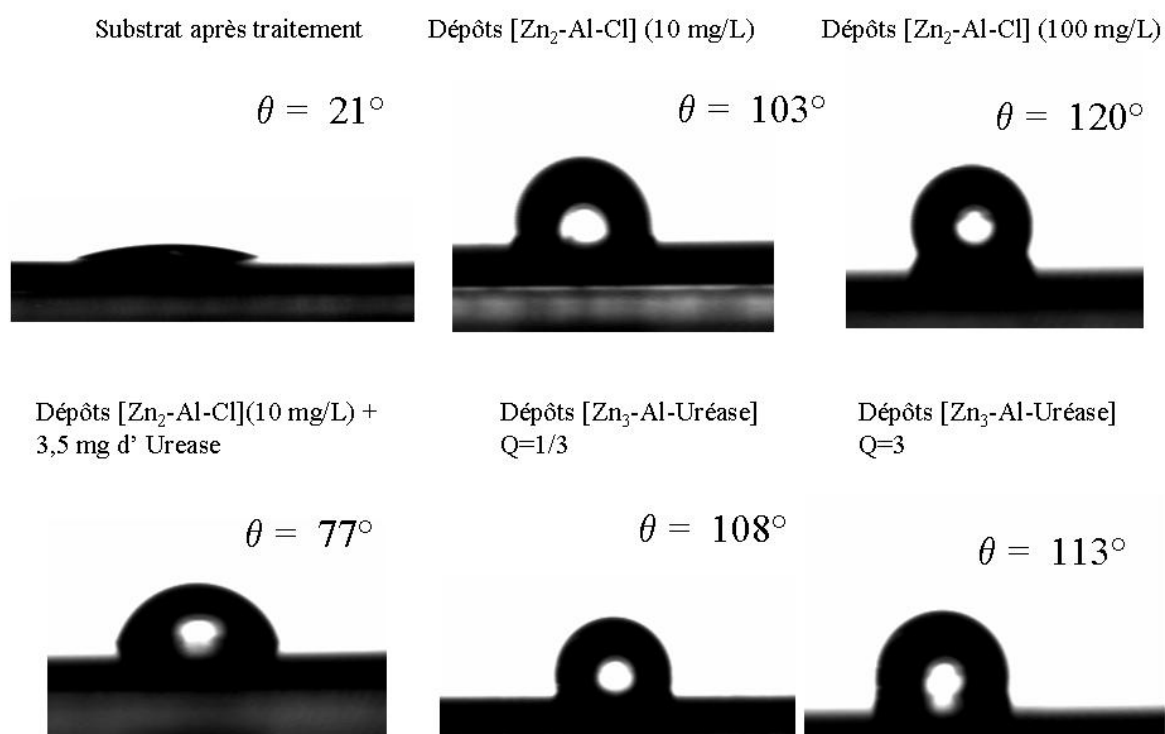


Figure 32 : Mouillabilité des films étudiés pour les différents supports  $\text{Si}_3\text{N}_4$  nu et modifiés

## V.2 Etude structurale par diffraction des rayons X

Les diffractogrammes de rayons X ont été réalisés sur les films déposés à la surface hydrophile  $\text{Si/SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$  dans les conditions standard d'acquisition pour les poudres. Le nombre de couches transférées est égal à 6.



Les diffractogrammes des films préparés avec les phases HDL (Figure 33) montrent uniquement les raies de diffraction (003) ( $d_{003} = 7,49 \text{ \AA}$ ) et (006) ( $d_{006} = 3,74 \text{ \AA}$ ) correspondant aux raies caractéristiques des phases de type hydrotalcite ce qui confirme le transfert effectif de films d'HDL sur le substrat. L'absence des raies de diffraction (hkl) indique la forte orientation préférentielle des plaquettes d'HDL parallèlement à la surface du support. Elle montre aussi la possibilité de réaliser des films minces de couches hybrides HDL orientées. L'intensité des raies dépend de la concentration d'argile mise en suspension puisque les raies pour un film élaboré à partir de 100 mg/L sont plus intenses. Par ailleurs, la distance interlamellaire déterminée ( $d = 7,49 \text{ \AA}$ ) suggère une carbonatation de la phase HDL.

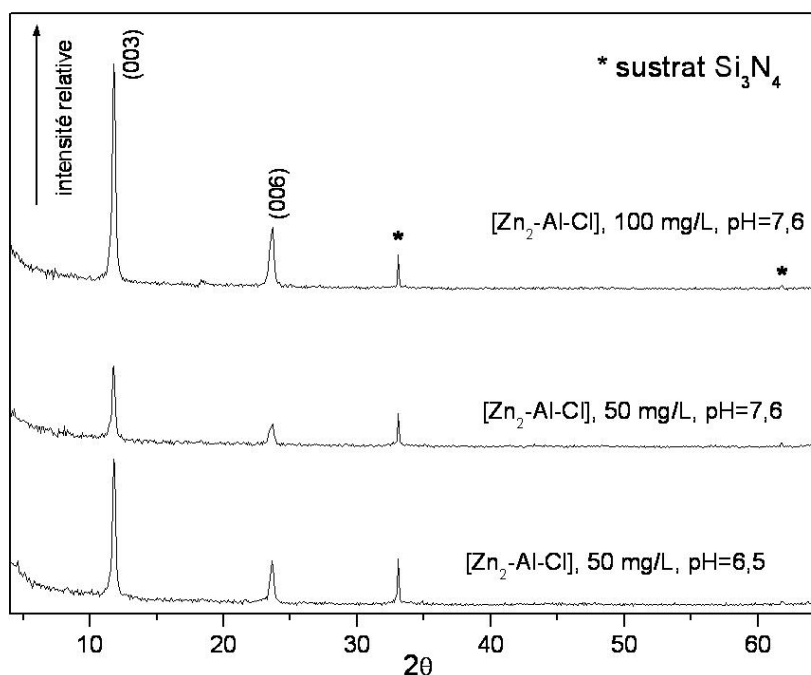


Figure 33 : Diffractogrammes des rayons X des films HDL

Les diffractogrammes X (Figure 34) des films hybrides ne révèlent que la présence de la raie de diffraction (003) pour les faibles concentrations en uréase ( $Q=1/5$  et  $1/3$ ). La distance interlamellaire est identique à celle déterminée pour les films HDL confirmant que l'uréase n'est pas intercalée entre les feuillets. L'intensité des raies diminue en augmentant la concentration d'uréase. Pour un rapport uréase/HDL = 1, les raies de diffraction de la phase HDL ne sont plus observées. On retrouve, dans ces expériences les mêmes observations structurales faites sur les matériaux hybrides HDL-Uréase. L'augmentation de la quantité d'uréase ( $Q$ ) dans le composé hybride a un effet destructurant fort sur l'auto-assemblage des plaquettes d'HDL. Dans la formation des films hybrides, on montre donc le même effet. La structuration des films est donc hétérogène et non en couches régulières alternées HDL-

Uréase-BA. Toutefois, les images de MEB et de microscopie optique (voir paragraphes suivants) ont montré que les dépôts étaient imparfaits et les substrats non entièrement recouverts ce qui peut expliquer en grande partie ces résultats.

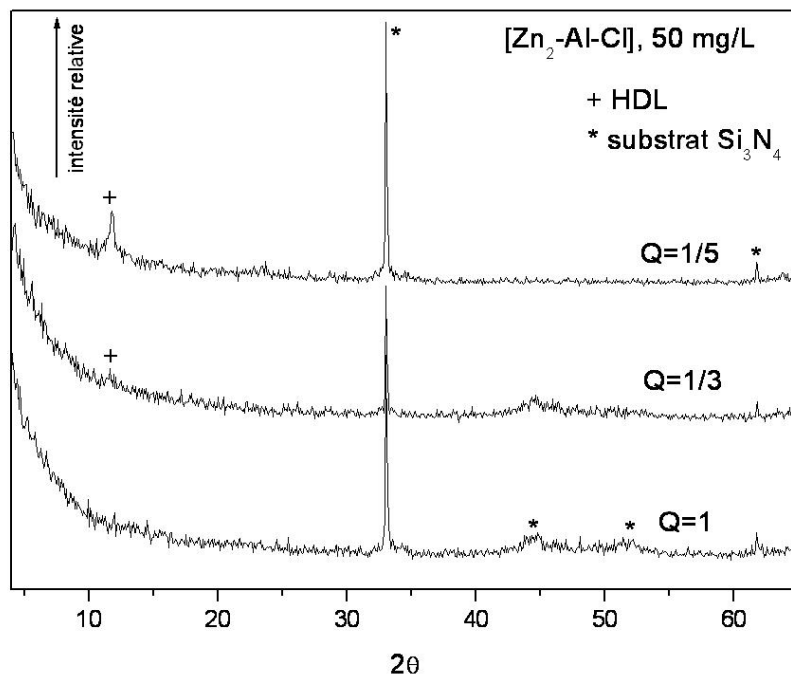
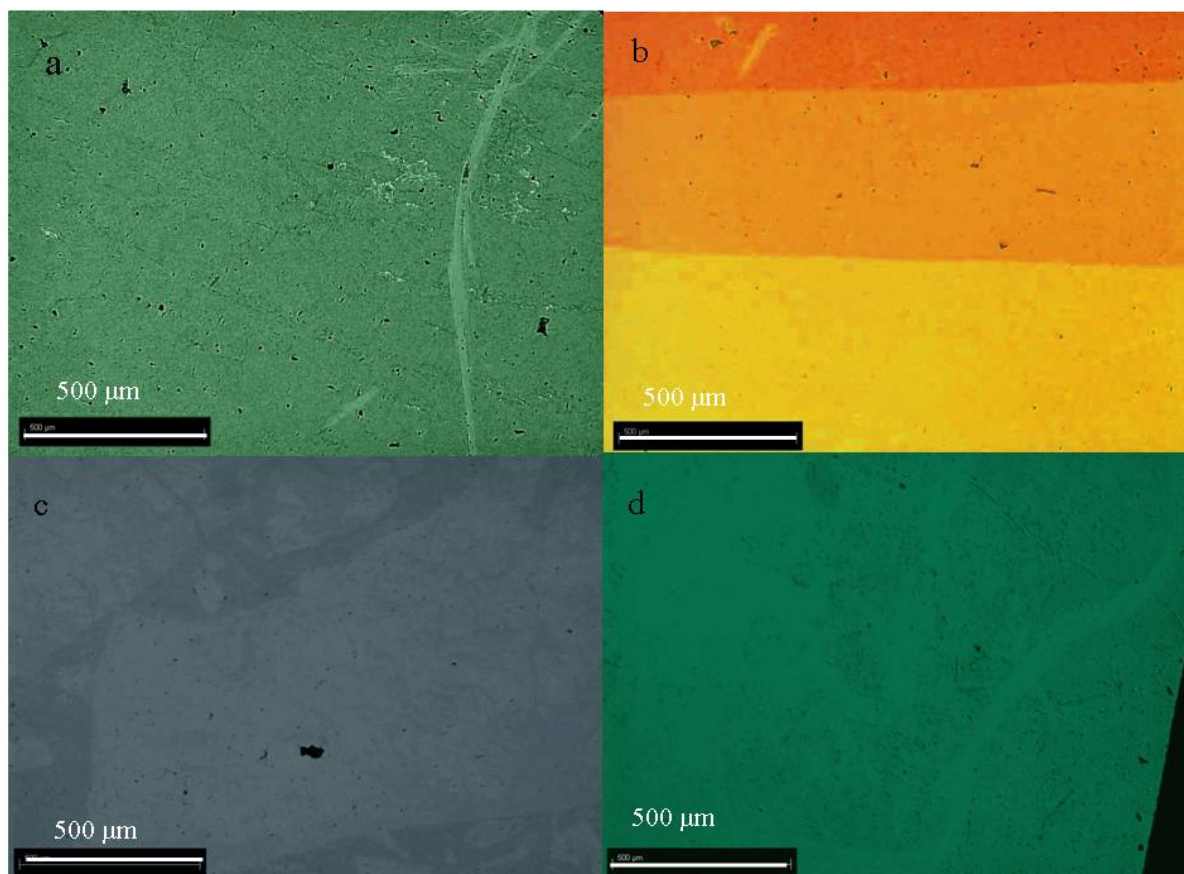


Figure 34 : Diffractogrammes des rayons X des films Uréase-HDL

### V.3 Caractérisation des couches par les techniques de microscopie

#### V.3.1 Etude par microscopie optique et microscopie électronique à balayage

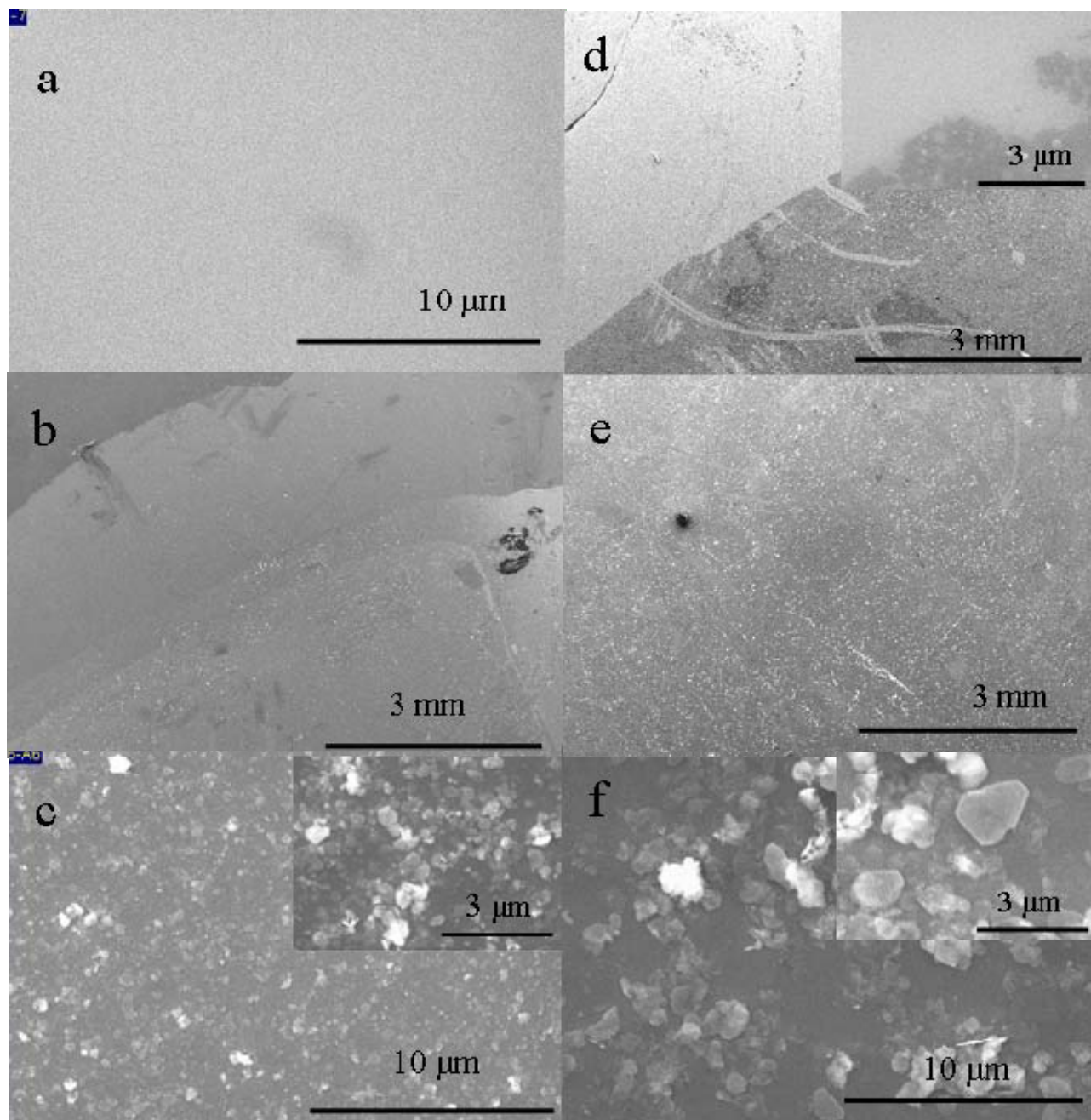
Une étude par microscopie à lumière polarisée a été réalisée sur divers dépôts afin d'étudier l'homogénéité des dépôts et l'orientation préférentielle des couches. Les Figures 35 a) et b) représentent les dépôts (6 couches) de  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ . Ces images révèlent la présence d'un film d'HDL déposé de manière homogène sur le substrat. La Figure 35 b) met en évidence les couches successives d'HDL-BA, avec de légères modifications de niveau mise en évidence par des colorations différentes. Les Figures 35 c) et d) représentent les dépôts de films hybrides ternaires HDL-uréase-BA sur substrats  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (hydrophile) et Au (hydrophobe) pour des rapports  $Q=1/3$  et 1, respectivement. Les images par microscopie montre que les films mixtes HDL-Urease sont beaucoup moins homogènes. Les films déposés sur  $\text{Si}_3\text{N}_4$  présentent une couverture partielle du substrat, pour le substrat Au, seuls les bords du support sont nappés.



**Figure 35 : Images par spectroscopie à lumière polarisée des films étudiés**

Les clichés de microscopie électronique à balayage ont été réalisés sur les films HDL seuls et avec uréase. Un cliché du support nu a été effectué pour permettre de comparer les différents films (Fig 36 a)). La surface est lisse et homogène. Par contre, dès que l'on transfère les particules d'argile sur le support, on observe des différences de surface.

Les clichés réalisés pour des dépôts de 6 couches de  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  (50 mg/L) montrent que la surface est totalement recouverte (Fig 36 b)). On observe plusieurs paliers caractérisant la succession de dépôts. En agrandissant, des particules hexagonales d'hydroxydes doubles lamellaires individuelles et orientées parallèlement à la surface sont identifiées. Leur taille se situe dans un domaine compris entre 250 et 500 nm. Les mêmes observations sont montrées pour un film de 6 couches de 50 mg/L de  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  à pH=7,6. Cependant, la taille des particules est plus importante de l'ordre de 700 nm et le dépôt est moins uniforme. Les clichés d'un film HDL-uréase révèlent une modification de surface identifiée par une différence de texture. Dans ce cas, on observe des particules d'HDL parsemées dans le film (200 et 400 nm).



**Figure 36 : Clichés par microscopie électronique à balayage des films étudiés a) support nu, b) et c)  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  d) e) uréase/ $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$   $Q=1/5$  et f)  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$**

### V.3.2 Etude par microscopie à force atomique

La technique AFM permet d'apprécier la qualité, l'homogénéité ainsi que la rugosité des couches. Elle permet d'obtenir des images topographiques en trois dimensions de la surface d'une couche moléculaire. Les analyses AFM ont été réalisées au Centre National d'Evaluation de Photoprotection (CNEP) par B. Mailliot.

Une analyse des différents substrats a été préalablement réalisée afin de confirmer la présence de dépôts après transferts des films LB. Les observations par AFM des différents échantillons indiquent un changement d'état de surface.

Dépôts de films  $[Zn_2-Al-Cl]$ -BA et  $[Zn_3-Al-Cl]$ -BA

La Figure 37 présente les clichés AFM concernant un dépôt de 4 couches de  $[Zn_3-Al-Cl]$ -BA à 10 et 100 mg/L sur un substrat  $Si_3N_4$  hydrophile.

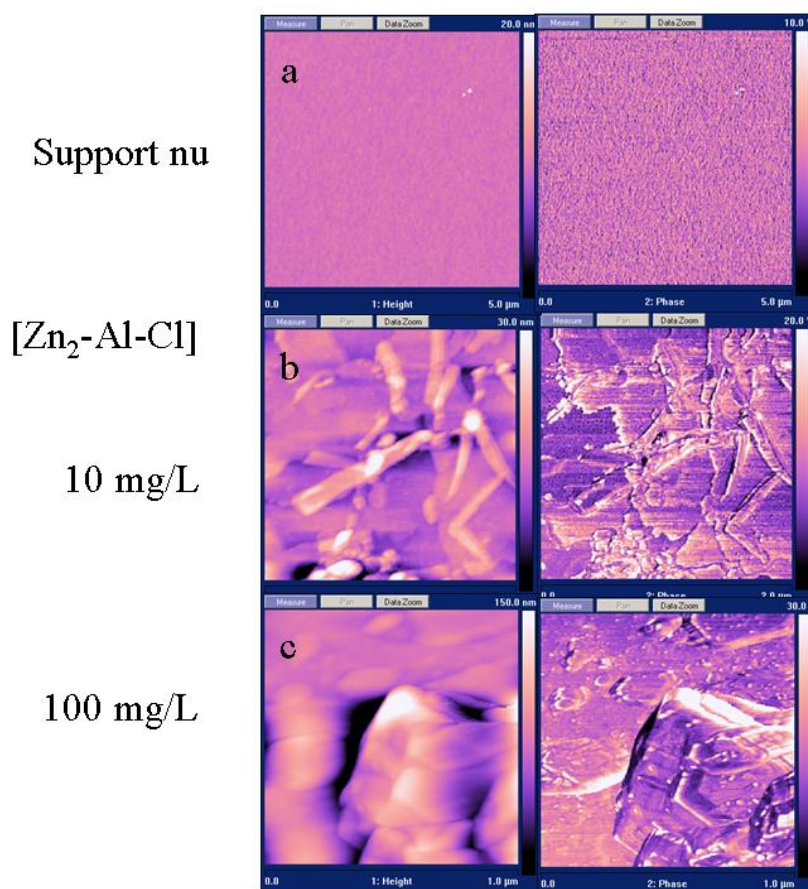
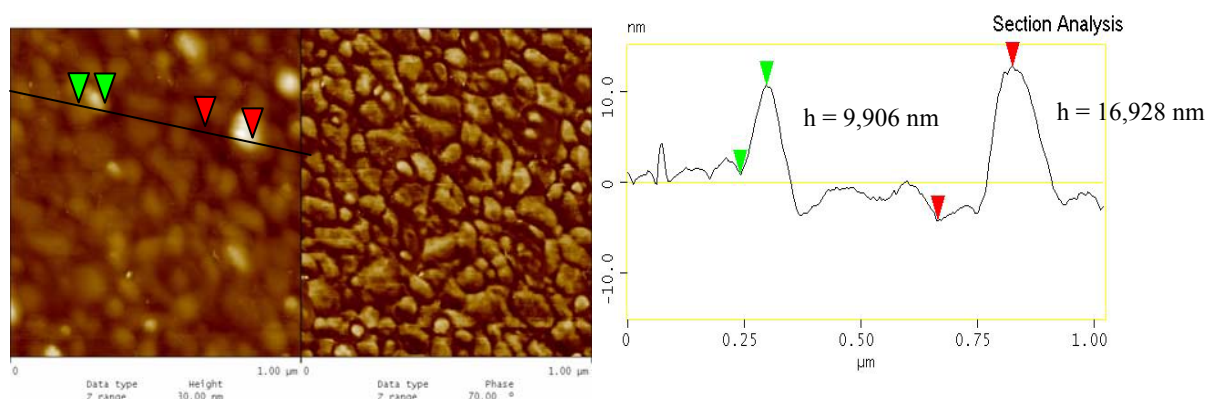


Figure 37 : Images AFM du support en nitrure de silicium nu et modifié par des films d'HDL

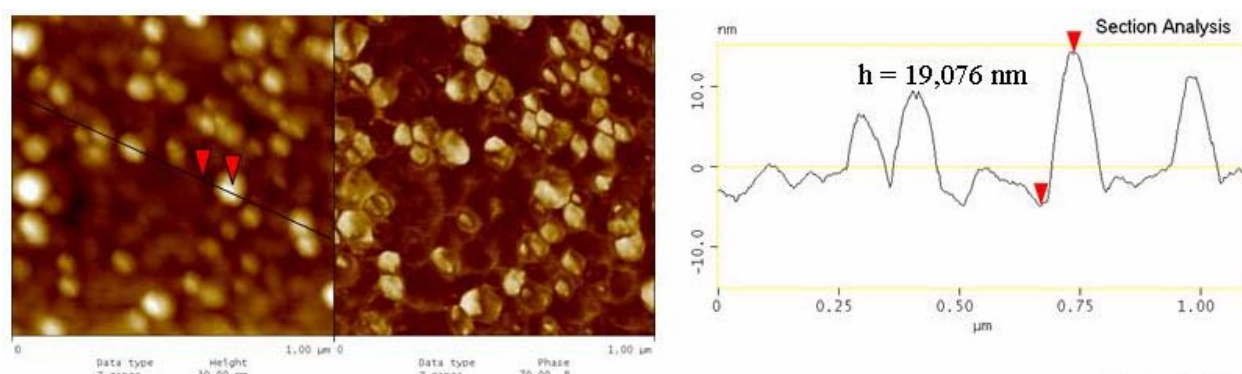
Dans ces deux cas, on observe la couverture totale du support. Les particules se recouvrent les unes les autres. En augmentant la concentration d'HDL, le transfert de grosses particules est favorisé et empêche la bonne analyse du dépôt.



Les Figures 38 et 39 présentent les dépôts de 4 couches de  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  de concentration initiale de 50 mg/L et les dépôts de 2 couches de la même phase à 100 mg/L sur un support hydrophobe en or.



**Figure 38 : Dépôts et analyse topographique de 4 couches de  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  de concentration initiale 50 mg/L sur un substrat hydrophobe en or.**



**Figure 39 : Dépôts et analyse typographique de 4 couches de  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$  de concentration initiale 100 mg/L déposé sur un substrat hydrophobe en or.**

Les clichés montrent que l'augmentation du nombre de transferts entraîne un nappage de particules sur toute la surface analysée. Cependant, le faible taux de recouvrement permet une meilleure résolution spatiale de l'auto-organisation des particules. L'étude topographique montre aussi la présence de particules de taille comprise entre 9,9 nm et 16,9 nm (~10 à 20 feuillet HDL), voire plus grosses pour des concentrations élevées (20 nm). Les largeurs de particules (30 – 100 nm) sont inférieures à celles mesurées par MEB. Les images permettent de mieux distinguer les formes hexagonales d'un grand nombre de plaquettes ainsi que l'empilement compact de celles-ci par les faces latérales. L'adsorption des particules d'HDL par la technique de Langmuir-Blodgett est particulièrement sélective. Les films sont formés avec les cristallites de plus petites tailles. Ces petites plaquettes permettent une plus grande

cohésion de la nanostructuration et facilitent un bon transfert et un taux de recouvrement des substrats élevé.

Les images obtenues pour les films  $[\text{Zn}_2\text{Al-Cl}]$ -BA confirment les observations précédentes : la formation d'un film dense de petites particules pour les 1<sup>ères</sup> couches déposées avec le transfert ultérieur de plus grosses plaquettes de forme bien définies (Figure 40).

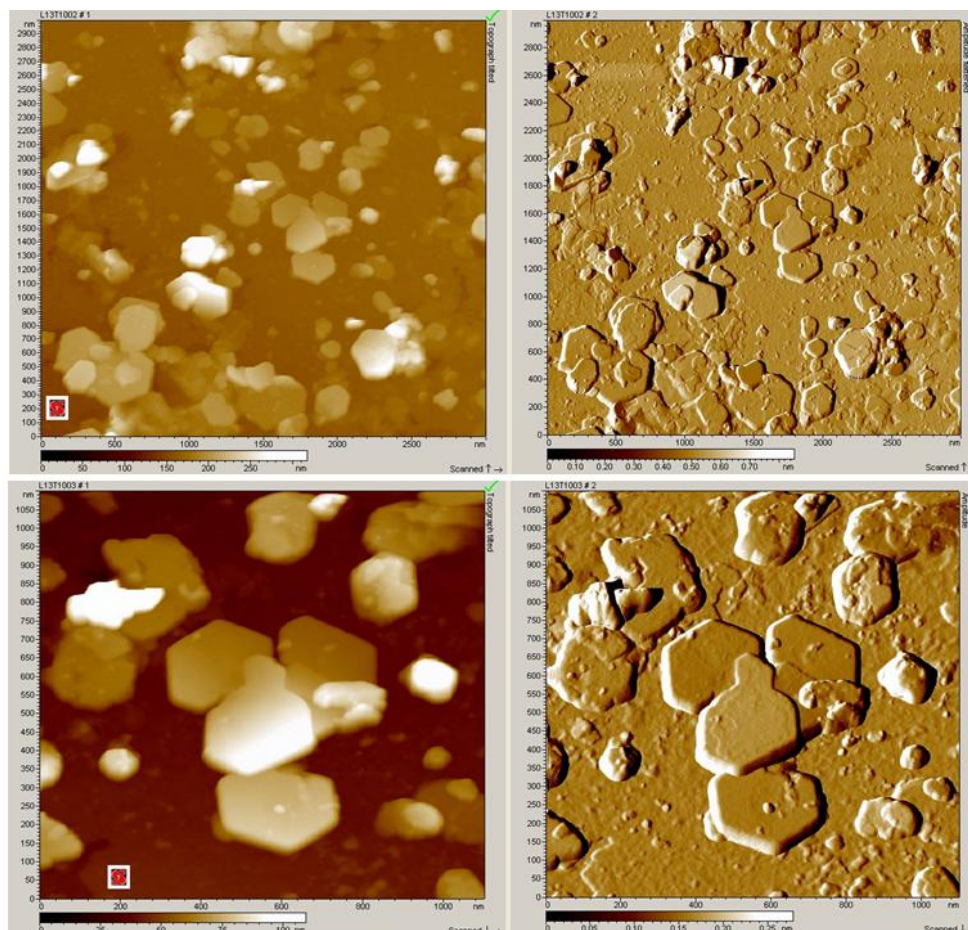


Figure 40 : Images AFM de 6 couches de  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  déposées sur un substrat hydrophile de  $\text{Si}_3\text{N}_4$

#### Dépôts de films $[\text{Zn}_2\text{AlCl}]$ -Uréase-BA

Les films hybrides  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ -uréase-BA présentent des zones de substrat non recouvertes et des zones correspondant à un assemblage mosaïque de petits objets de taille très homogène d'environ 50 nm (Figure 41). Les joints de grains sont bien identifiés, ce qui est en faveur d'une agrégation de particules inorganiques. Les résultats à ce stade ne sont pas suffisants pour apporter des conclusions définitives. Des analyses chimiques sont à envisager et de

nouveaux dépôts à réaliser. Si les hypothèses se confirment, il semblerait que la formation de films ternaires  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ -urée-BA soit obtenu uniquement avec les particules d'HDL les plus petites. Cette proposition semble en accord avec la moins grande stabilité de ces films mixtes ternaires due à la substitution des interactions fortes Feuilles HDL / monocouche de BA des assemblage binaires bien structurés  $[\text{Zn}_2\text{Al-Cl}]$ -BA par des interactions plus faibles Feuilles HDL / urée dans des couches désordonnées.

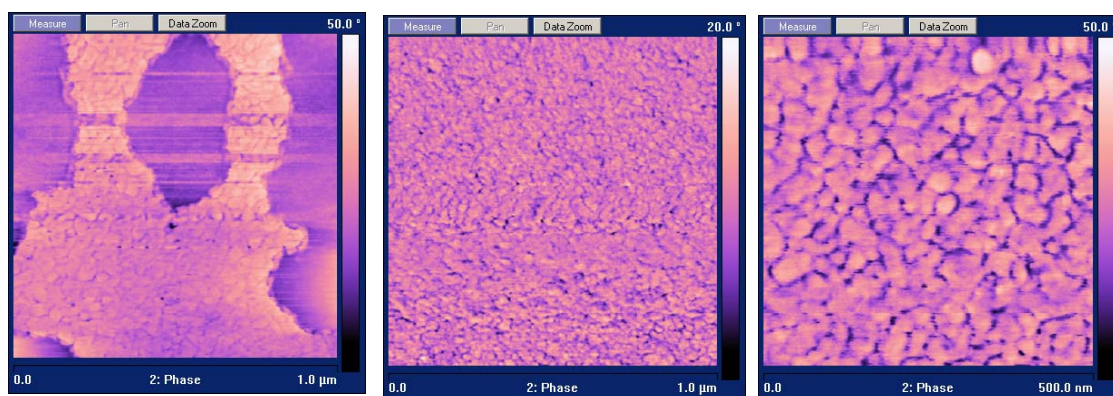


Figure 41 : Images AFM de 4 couches de  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ -Urée pour un rapport urée/HDL= 1/3

Les images des films des phases  $[\text{Zn}_3\text{Al-C}]$ - urée-BA déposés sur un substrat en or suggèrent la présence de gouttelettes d'urée ( $\Phi \sim 200$ ) qui nappent les particules (Figure 42). Cependant, les images montrent l'inhomogénéité des dépôts.

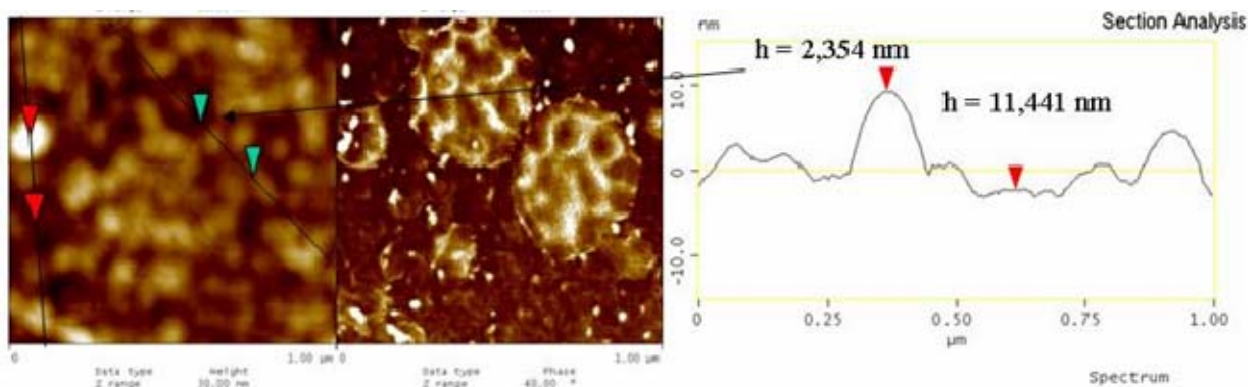


Figure 42 : Images AFM et analyse topographique de 4 couches de  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$ -Urée pour un rapport  $Q = 1$  déposées sur un substrat hydrophobe en or



## VI : Discussion

L'organisation des films HDL-BA et HDL-Uréase-BA repose dans un premier temps sur la formation de films LB à l'interface air-eau, puis sur le transfert de ces couches monomoléculaires à la surface de support.

### La formation des films LB à l'interface air/eau

#### Système binaire HDL-BA

La formation des films HDL-BA est fortement favorisée par les interactions entre ces deux composés qui régissent la stabilité du film à l'interface air-eau.

L'étude sur la cinétique d'adsorption des particules d'HDL sur le film monomoléculaire d'amphiphiles nous a permis de mieux comprendre les équilibres d'adsorption désorption entre ces deux systèmes. En présence d'une suspension d'argile, la vitesse d'adsorption est lente. Dans un premier temps, les agrégats d'HDL interagissent avec l'acide béhénique et tombent au fond de la cuve. La concentration de la molécule amphiphile à l'interface air-eau diminue entraînant un abaissement de la tension du film (Figure 43).

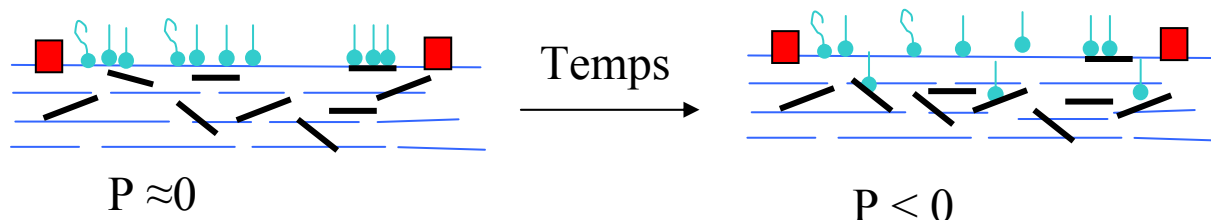
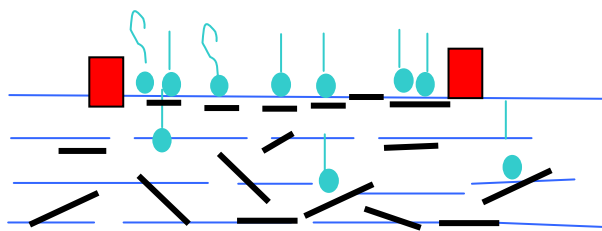


Figure 43 : Phénomène d'adsorption dès le contact entre le BA et les particules d'HDL

Il faut donc un certain temps pour stabiliser la suspension d'argile c'est-à-dire pour atteindre un gradient de la taille des particules. Les petites particules auront tendance à s'approcher de l'interface air-eau alors que les plus grosses seront entraînées vers le fond de la cuve (Figure 44). Pour favoriser le phénomène d'adsorption, il est possible d'augmenter la concentration d'HDL.

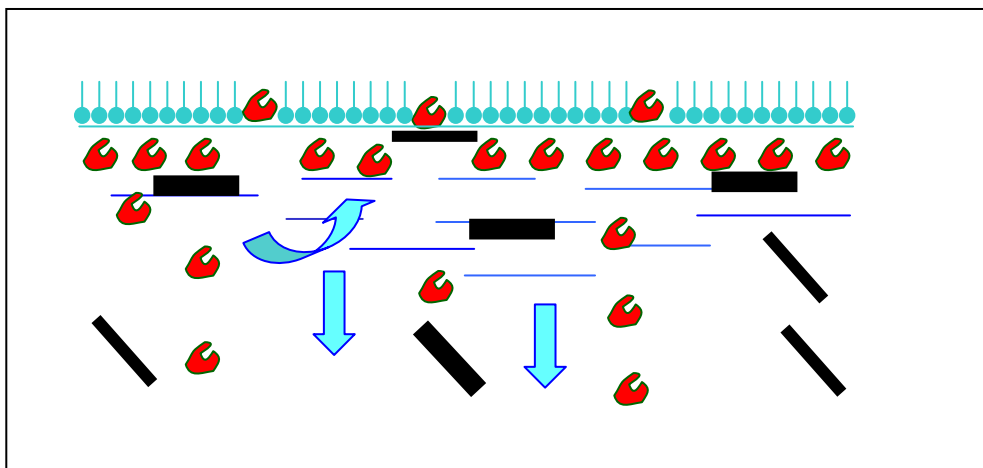


**Figure 44 : formation d'un film stable après quelques heures d'adsorption**

De plus, la formation du film repose sur des interactions électrostatiques entre l'acide béhénique et les particules d'HDL. L'augmentation des énergies de liaison est favorisée par un état d'ionisation de l'acide béhénique plus important. En effet, l'aire moléculaire passe de 17 à 18 Å<sup>2</sup> entre des valeurs de pH comprises entre 6,5 et 7,6 lié aux interactions répulsives entre les têtes polaires. La phase  $[\text{Zn}_R\text{-Al-Cl}]$  dispose de surfaces libres différentes en fonction de la densité de charge, c'est-à-dire de  $R$ . Pour les phases  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  et  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$ , la surface libre est de 24 et 31 Å<sup>2</sup>/e, respectivement. Par conséquent, la compatibilité surface libre-aire moléculaire est favorable aux systèmes HDL en général et  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ -BA en particulier. En effet, les expériences ont montré que les interactions entre ces composés étaient plus fortes entraînant une augmentation de la tension du film en fonction du temps à 0 mN/m et la formation d'un film plus stable et plus homogène.

#### Système ternaire HDL-Uréase-BA

La cinétique d'adsorption en présence d'enzyme est plus rapide et engendre une augmentation de la tension du film (Figure 44). Ce phénomène peut être expliqué par le caractère amphotère Hydrophile/Hydrophobe de l'enzyme qui entraîne la biomolécule vers l'interface air-eau. L'augmentation de la tension du film est par conséquent induite par une concentration d'uréase plus élevée. En effet dans ces conditions, la concentration en uréase libre est plus importante. Cependant, la différence des isothermes en fonction de la densité de charge de la phase  $[\text{Zn}_R\text{-Al-Cl}]$  suggère la participation de la matrice inorganique lors de la formation du film. La stabilité du film est favorisée par les associations HDL-BA et HDL-Uréase qui sont plus fortes avec la phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ . En effet, le coefficient d'adsorption de l'uréase sur la matrice HDL augmente lorsque la densité de charge est plus élevée (chapitre 3).



**Figure 45 : Phénomène d'adsorption du système ternaire HDL-Urée-BA**

Cependant, si l'urée est confinée directement dans la matrice. La formation du film sera régie à la fois par l'HDL et par l'urée.

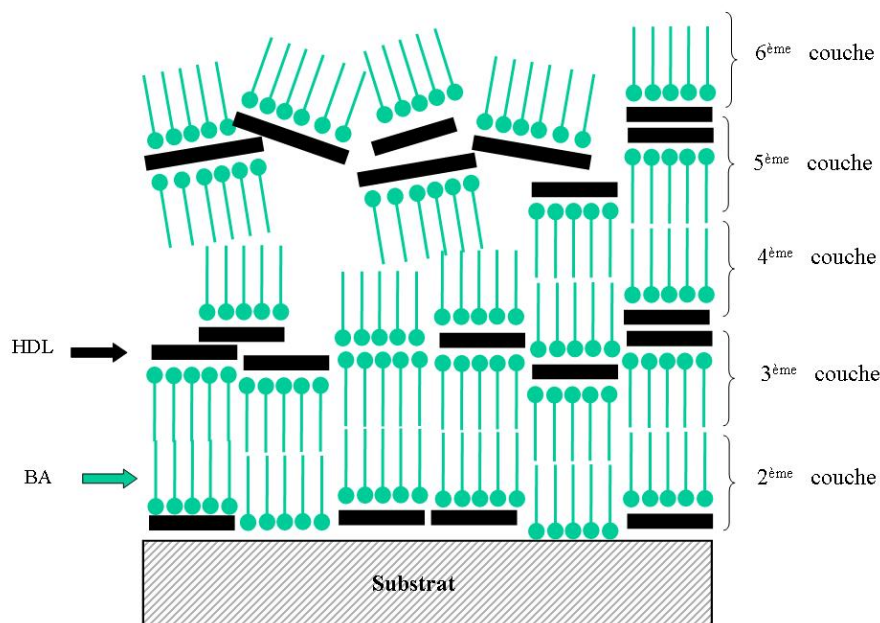
#### Les transferts

Après l'étude sur la formation des films hybrides, ces derniers sont transférés sur un support à une pression de surface préalablement déterminée.

#### Système binaire HDL-BA

Les différentes techniques de caractérisation ont confirmé le transfert des phases HDL sur divers substrats. Cependant, les transferts réalisés sur un support  $\text{Si}_3\text{N}_4$  lisse et hydrophile ont montré des dépôts de meilleure qualité. Ce phénomène est sûrement dû aux propriétés hydrophiles de la matrice inorganique. Les images microscopiques ainsi que la diffraction des rayons X montrent une orientation préférentielle des particules, déposées parallèlement à la surface du support. En outre, dans un premier temps, il semble que les petites particules soient transférées et nappent la totalité de la surface. Puis, en augmentant le nombre de passages dans la solution, les plus grosses particules sont alors transférées. Il est à noter que cette méthode est sélective puisqu'elle permet d'exfolier les particules d'HDL et par conséquent de dissocier les petites et grosses particules. Le dépôt de film BA-HDL donne un caractère hydrophobe à la surface suggérant que le BA interagit avec les particules individuelles d'HDL via leur tête polaire orientant la queue hydrophobe vers l'extérieur. Dans ce cas, le transfert de type Y se fait à l'immersion et à l'émersion. L'assemblage de couches par interaction successive hydrophile-hydrophile et hydrophobe-hydrophobe est favorisé par la formation de

feuillets hybrides  $[\text{Zn}_R\text{-Al}]$ -BA. La Figure 46 illustre les transferts des films HDL-BA sur un substrat hydrophile  $\text{Si}_3\text{N}_4$ .



**Figure 46 : Schéma représentatif des successions de couches HDL-BA sur un substrat hydrophile (pas à l'échelle)**

#### Système ternaire HDL-Uréase-BA

La caractérisation des films HDL-Uréase-BA s'est avérée plus difficile et les observations stipulées restent hypothétiques. Même si les isothermes  $\pi$ -A suggèrent la formation de films HDL-Uréase-BA, la surface des supports étudiés montre des dépôts inhomogènes. Pour de faibles concentrations d'uréase, la présence de la matrice inorganique est confirmée. Par contre, pour des concentrations élevées, aucune méthode de caractérisation ne montre sa présence. Nous allons donc nous focaliser sur les films réalisés avec des rapports uréase/HDL = 1/3. Les images AFM suggèrent la formation de zones de petites particules d'HDL de tailles inférieures à celles déterminées pour le système binaire. Dans le cas de dépôts sur des substrats hydrophobes en or, des gouttelettes d'enzyme semble napper des particules d'argiles. La Figure 47 donne une représentation de ce que pourrait être une succession de dépôts du films HDL-Uréase-BA avec toutes les combinaisons d'interactions possibles : BA-Uréase, Air-Uréase, BA-HDL et Uréase-HDL.

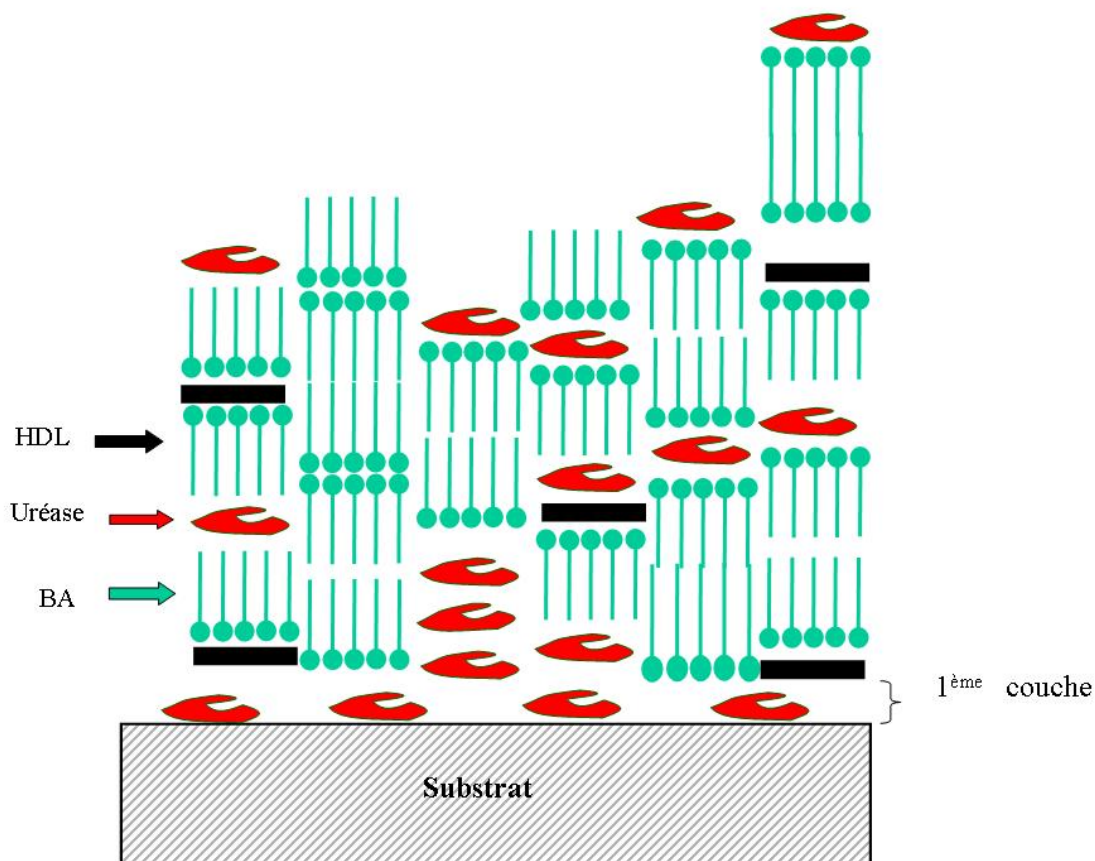


Figure 47 : Schéma représentatif des successions de couches du film HDL-Uréase-BA sur un substrat hydrophile (pas à l'échelle)

## VII Conclusion

La méthode Langmuir – Blodgett a permis de réaliser des films homogènes BA-HDL. La première partie de cette étude a montré la formation de films mixtes BA-HDL et BA-Uréase-HDL à l'interface air-eau. La stabilité est engendrée par la présence de la phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  dont la surface libre est en meilleur accord avec l'aire moléculaire de l'acide béhénique comparée à la phase  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$ . Les mêmes observations ont été faites dans les suspensions HDL-uréase. Les images de microscopie électronique montrent la présence de plaquettes hexagonales individuelles orientées parallèlement à la surface des substrats. L'exfoliation des particules engendre un gradient de taille favorisant l'interaction dans un premier temps avec les petites puis avec les plus grosses. Cependant, lors de la mise en suspension de l'uréase avec l'hydroxyde double lamellaire, différents systèmes coexistent : BA-HDL, BA-Uréase, Uréase-HDL et Uréase-Air. Le système se complique. La nanostructuration devient moins

homogène. La présence d'uréase libre semble empêcher l'adsorption des particules d'argile à l'interface air-eau. Une étude sur la formation de film BA- $[Zn_3-Al-Uréase]$  a montré que ce système semblait être un bon compromis pour la réalisation de film hybride uréase-enzyme. Pour confirmer cette hypothèse, des mesures électrochimiques pour la réalisation de biocapteurs ont été effectuées et seront discutées dans le chapitre 6.

Cette étude est une première approche concernant la formation de films LB d'hydroxydes doubles lamellaires et de films hybrides HDL-Uréase. D'autres études peuvent être réalisées pour améliorer la qualité des dépôts. Nous avons vu précédemment que les films de molécules amphiphiles présentaient plusieurs polymorphismes en fonction de la température et de la pression de surface. Il serait donc intéressant d'étudier les systèmes binaires et ternaires suivant ces deux paramètres afin peut être d'obtenir des films plus stables et par conséquent des dépôts plus homogènes. Par exemple, l'aire moléculaire du BA augmente avec la température et sa valeur se rapproche de celle de la surface libre des phases HDL. La plus forte compatibilité entre les deux valeurs devrait améliorer la stabilité du film.

Pour remédier aux problèmes rencontrés sur les films HDL-Uréase-BA, il serait peut-être judicieux de faire des dépôts successifs de films HDL-BA alternés avec des films Uréase-BA.



## **Chapitre 6**

# **Activité de l'uréase immobilisée dans les Hydroxydes Doubles Lamellaires- Réponses du biocapteur**





## Sommaire

<b><i>I</i></b>	<b><i>Introduction</i></b> .....	<b>259</b>
<b><i>II</i></b>	<b><i>Activité enzymatique de l'uréase immobilisée dans les Hydroxydes Doubles Lamellaires</i></b> .....	<b>259</b>
<b><i>II.1</i></b>	<b><i>Mécanismes liés à l'activité enzymatique</i></b> .....	<b>259</b>
<b><i>II.2</i></b>	<b><i>Etude Bibliographique</i></b> .....	<b>260</b>
<b><i>II.3</i></b>	<b><i>Activité enzymatique</i></b> .....	<b>264</b>
<b><i>II.3.1</i></b>	<b><i>Protocole Expérimental</i></b> .....	<b>264</b>
<b><i>II.3.2</i></b>	<b><i>Activité enzymatique des phases préparées par copréciptation</i></b> .....	<b>266</b>
<b><i>III</i></b>	<b><i>Réponses du biocapteur</i></b> .....	<b>272</b>
<b><i>III.1</i></b>	<b><i>Réalisation d'un biocapteur enzymatique</i></b> .....	<b>272</b>
<b><i>III.1.1</i></b>	<b><i>Les biocapteurs à urée</i></b> .....	<b>272</b>
<b><i>III.1.2</i></b>	<b><i>Les biocapteurs à phosphates organiques</i></b> .....	<b>274</b>
<b><i>III.1.3</i></b>	<b><i>Réponses du biocapteur</i></b> .....	<b>276</b>
<b><i>III.2</i></b>	<b><i>Etude des biocapteurs basés sur l'immobilisation de l'uréase dans les HDL</i></b> .....	<b>279</b>
<b><i>III.2.1</i></b>	<b><i>Principe de la méthode de mesure</i></b> .....	<b>279</b>
<b><i>III.2.2</i></b>	<b><i>Réalisation des biocapteurs</i></b> .....	<b>280</b>
<b><i>III.2.3</i></b>	<b><i>Réponses électriques des biocapteurs à urée</i></b> .....	<b>281</b>
<b><i>III.3</i></b>	<b><i>Discussion</i></b> .....	<b>285</b>
<b><i>IV</i></b>	<b><i>Conclusion</i></b> .....	<b>287</b>



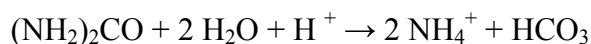
## I Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons optimisé les conditions d'immobilisation de l'uréase dans les matrices lamellaires de type HDL [Zn<sub>R</sub>Al] et de transfert de films minces Langmuir-Blodgett. Les résultats expérimentaux ont montré qu'il était possible de moduler les quantités de biomolécules immobilisées et leur confinement. Dans ce chapitre, nous présentons les résultats des mesures des activités enzymatiques de l'uréase immobilisée. La finalité de cette étude étant la détection de l'urée. Des biocapteurs utilisant les matériaux hybrides HDL/Urée, sous forme de suspensions ou de films LB déposés, ont été réalisés et leurs performances électriques mesurées.

## II Activité enzymatique de l'uréase immobilisée dans les Hydroxydes Doubles Lamellaires

### II.1 Mécanismes liés à l'activité enzymatique

L'uréase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'urée selon la réaction suivante :



Cette réaction a lieu au niveau du site actif constitué d'un complexe binucléaire Ni<sup>2+</sup>-Ni<sup>2+</sup> coordonnés par des résidus d'acides aminés. La Figure 1 montre la structure de l'uréase et de son site actif.

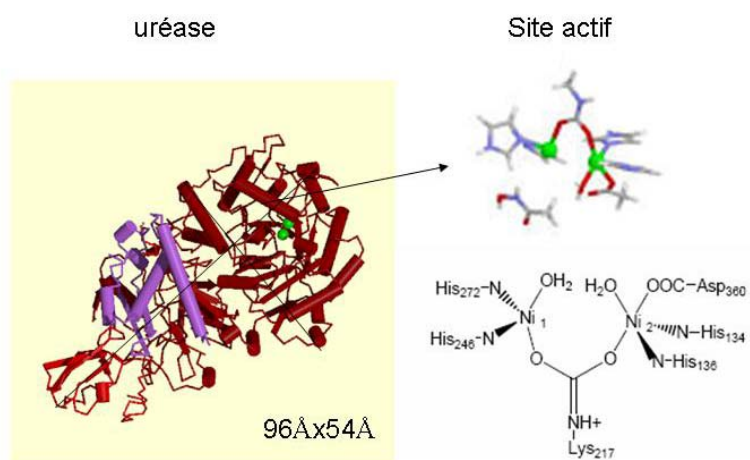


Figure 1 : schéma représentatif de l'uréase et de son site actif

Deux mécanismes d'hydrolyse de l'urée ont été proposés dans la littérature (Figure 2). Le premier a été élaboré par Karplus et Haussinger<sup>1</sup>. La molécule d'urée vient se greffer sur un ion nickel par son groupement carbonyle. Puis, la molécule subit une attaque nucléophile par l'ion hydroxyde lié au deuxième nickel. La seconde proposition, faite à partir de l'étude de Ciurli et coll<sup>2</sup>, suggère que l'urée vient directement se coordonner avec les deux ions nickel et que l'attaque nucléophile est provoquée par le groupement hydroxyle ponté entre les deux métaux.

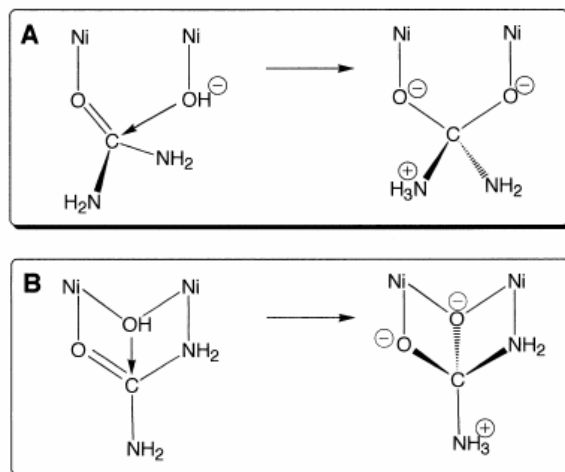


Figure 2 : Illustration des deux mécanismes concernant l'hydrolyse de l'urée<sup>2</sup> A) mécanisme de Karplus et Kaussinger et B) mécanisme de Ciurli

## II.2 Etude Bibliographique

Diverses études concernant l'immobilisation d'enzymes dans des matrices de confinement ont montré que l'activité spécifique de l'enzyme diminuait après immobilisation. Cette baisse d'activité dépend de la méthode d'immobilisation, de la nature de la matrice utilisée et des conditions expérimentales (T, pH). La perte d'activité du matériau hybride peut être provoquée :

- soit par la dénaturation de l'enzyme due à un changement de conformation, engendré par les interactions avec la matrice de confinement. Ces modifications structurales conduisent à une déformation du site catalytique qui perd son affinité spécifique vis à vis du substrat. Ce phénomène est souvent invoqué lors du confinement d'enzyme par greffage covalent qui peut altérer chimiquement les sites actifs.

<sup>1</sup> P.A. Karplus, M.A. Pearson, R.P. Haussinger, Accounts Chemical. Research, 30, 330, 1997

<sup>2</sup> S. Ciurli, S. Benini, W.R. Rypniewski, K.S. Wilson, S. Miletto, S. Mangani, Coordination Chemistry Reviews, 190-192, 331-355, 1999

- soit par un blocage de l'accessibilité au site actif, dû à un assemblage Enzyme/Matrice défavorable, une porosité de la matrice de confinement faible empêchant la diffusion du substrat, ou encore un taux d'agrégation élevé d'enzymes,
- soit par un relargage de l'enzyme en solution dans le cas d'un confinement peu efficace. Pour prévenir contre ce relargage, le matériau hybride est souvent placé dans une vapeur de glutaraldéhyde qui permet de réticuler l'enzyme et de la stabiliser dans la matrice,
- la dénaturation peut s'accroître avec le temps en fonction des conditions de stockage. Il est donc nécessaire de tester cette activité rapidement dans une solution tampon au pH de l'enzyme.

Cependant, l'immobilisation des enzymes dans des matrices présente un avantage majeur car elle améliore leur stabilité par rapport aux conditions agressives de température, d'acidité et de propriétés électrolytiques des milieux d'utilisation.

Le Tableau 1 (ci-contre) résume le comportement de l'activité enzymatique lors de l'immobilisation de l'uréase.

**Tableau 1 : Influence de l'immobilisation, du pH, de la température et du temps sur l'activité enzymatique de l'uréase**

Matrice	Activité enzymatique comparée à l'enzyme libre et Discussion		Effet pH	Effet température	Effet stockage
Montmorillonite Complexe M-A $\text{Al(OH)}_x^3$  <b>Adsorption</b>	71 % 64% 15 %	L'activité diminue avec l'augmentation de la quantité d'uréase et la présence d' $\text{Al(OH)}_x$ qui réduit la quantité d'uréase adsorbée et inhibe fortement l'activité de l'enzyme	Le pH optimal de l'enzyme libre est 7 – 7,5. et $\downarrow$ 50% ( pH=6 et 8- 8,5). Effet moins marqué sur l'uréase immobilisée	T° optimale de : Urée libre : 60 – 70 °C. Avec M : 50 – 70° C Avec AM : 40 – 70 °C $\nearrow$ du domaine de température	- Effet 1h à 60 °C La stabilité thermique est meilleure pour l'uréase libre. - Effet protéase ( 2 – 24 h ) : $\text{Al(OH)}_x$ protège l'uréase
Ca- polygalacturonate <sup>4</sup>  <b>Adsorption</b>	100 %	Influence de la force ionique : diminution de l'activité enzymatique provoquée par la désorption de l'uréase à haute force ionique	pH optimal pour urée libre et immobilisée = 8. L'activité de l'uréase immobilisée est plus forte dans un domaine compris entre 5 et 8. Cela peut être du à la présence de groupements carboxylates	T° optimale : 30-40 °C 60 °C : l'activité de l'enzyme libre diminue à 10 % de son activité initiale alors que l'enzyme immobilisée est à 80 %. 70 °C : désactivation de l'enzyme libre et immobilisée.	Effet du temps en présence ou non de pronase. <b>Sans</b> : amélioration de la stabilité de l'enzyme immobilisée. Après 9 jours, l'activité de l'uréase libre est de <b>10 %</b> alors qu'immobilisée, elle garde <b>60 %</b> de son activité <b>Avec</b> : 5 jours : absence d'activité de l'uréase libre mais urée immobilisée garde <b>20 %</b> de son activité
Membranes de polymères fonctionnalisées <sup>5</sup>  <b>Greffage</b>	10 %	le changement de conformation de l'enzyme cause une inactivation provoquée par la participation du site actif dans la réaction de greffage covalent.	pH optimal pour urée libre ou immobilisée : 7 amélioration envers les pH acides et basiques		L'activité enzymatique a été répétée 5 fois sur la même membrane : pas de diminution de l'activité . Enzyme non désactivée et non relarguée en présence de tampon phosphate

<sup>3</sup> L. Gianfreda, M.A. Rao, A. Violante, Soil Biological Biochemistry, 24 (1), 51-58, 1992

<sup>4</sup> S. Ciurli, C. Marzadori, S. Benini, S. Deiana, C. Gessa, Soil Biological Biochemistry, 28 (6), 811-816, 1996

Activité de l'uréase immobilisée dans les HDL – Réponses du biocapteur

Matrice	Activité enzymatique comparée à l'enzyme libre et Discussion		Effet pH	Effet température	Effet stockage
Capsule de polyélectrolyte <sup>6</sup> <b>encapsulation</b>	13 %	Cette diminution peut être provoqué par la difficulté de diffusion du substrat à travers la membrane de la capsule.			L'activité de l'uréase à l'intérieur des capsules est stable : Après 5 jours de stockage à 7°C, l'uréase encapsulée a complètement préservé son activité alors que l'uréase libre a perdu 45 % de son activité initiale.
Capsule de multicouches d'uréase et polyélectrolyte <sup>7</sup>  <b>Capsule par la méthode couche par couche</b>	25 %	Cette diminution peut être provoquée par une limitation de la diffusion de l'urée et la difficulté d'atteindre les sites actifs.			

---

<sup>5</sup> T. Miyata, A. Jikihara, K. Nakamae, J. Applied Polymer Science, 1579-1588, 1997

<sup>6</sup> Y. Lvov, Nano Letters, 1 (3), 125-128, 2001

<sup>7</sup> Y. Lvov, F. Caruso, Analytical Chemistry, 73, 4212-4217, 2001



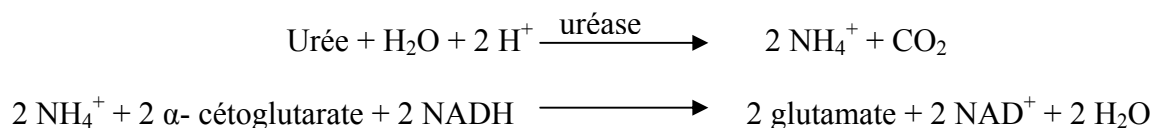
## II.3 Activité enzymatique

### II.3.1 Protocole Expérimental

L'activité enzymatique de l'uréase se définit comme la quantité en  $\mu\text{mole}$  de  $\text{NH}_4^+$  libérée par minute et pour un mg de produit à  $\text{pH}=7,0$  et à  $25^\circ\text{C}$ .

La mesure de l'activité enzymatique de l'uréase peut se faire par plusieurs méthodes :

- la méthode de Worthington<sup>8</sup> qui consiste à suivre la disparition de la bande d'absorption de NADH à 340 nm en fonction du temps. Ce phénomène résulte de l'oxydation de NADH par la glutamate déshydrogénase en présence d'ions  $\text{NH}_4^+$  préalablement générés par l'hydrolyse de l'urée au niveau du site actif de l'uréase. Les réactions qui ont lieu sont les suivantes :



- la méthode de Weatherburn<sup>9</sup> consiste à mettre une solution d'urée de concentration connue dans une solution tampon phosphate – EDTA à  $\text{pH}=6,5$  contenant l'uréase. L'hydrolyse de l'urée a lieu pendant 15 minutes à  $37^\circ\text{C}$  puis est stoppée par ajout d'une solution de phénol-pentacyanitrosylo ferrate et d'une solution NaOH-Hyperchlorite de sodium. Au bout de 5 minutes à  $37^\circ\text{C}$ , la couleur est développée. La solution est alors analysée à 625 nm.
- l'utilisation d'une électrode spécifique à ammonium<sup>10</sup> permet de suivre la décomposition de l'urée par l'uréase en dosant les ions  $\text{NH}_4^+$  relargués.

La méthode que nous avons utilisée consiste à suivre cette décomposition à l'aide d'une électrode spécifique à ammonium. L'enzyme commerciale utilisée présente une activité nominale de 82,8 unité/mg. L'activité enzymatique de l'uréase libre et immobilisée a été déterminée par le dosage des ions  $\text{NH}_4^+$ . Pour déterminer l'activité enzymatique, on trace la

<sup>8</sup>I. Ivanovic, P. Todorovic, L. Matijevic; V. Savic, G. Grujevski, Arhiv za Farmaciju (1981), 31(3), 101-6.

<sup>9</sup> Y. Murat Elçin, Biomaterials 16, 1995, 1157-1161

<sup>10</sup> G. G. Guilbault, G. Nagy, Analytical Chemistry, 45 (2), 1973, 417-419

courbe représentant le nombre de moles de  $\text{NH}_4^+$  libéré par mg d'uréase en fonction du temps en minute. La pente obtenue permet alors de déterminer la vitesse de décomposition en  $\mu\text{mole/mg/min}$  et par conséquent de déduire l'activité enzymatique.

Le protocole est le suivant :

- 5 à 10 mg d'uréase sont dissoutes dans 25 ml de solution tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) de concentration 0,1 M et de  $\text{pH}=7,4$ . 1 ml de solution d'urée à  $4,16.10^{-4}$  moles est ensuite ajouté. L'évolution de la concentration des ions  $\text{NH}_4^+$ , générés au cours de la réaction enzymatique, est suivie en fonction du temps.
- dans le cas de l'uréase immobilisée, la masse d'échantillon prélevée pour chaque expérience correspond à une quantité d'uréase de 5 mg.

L'utilisation de solution tampon phosphate ayant pour effet le relargage d'enzyme en solution, nous avons donc déterminé la quantité d'uréase libérée. Ces mesures ont été entreprises afin de connaître la part de l'uréase réellement immobilisée sur l'activité enzymatique déterminée par notre procédé. Dans un premier temps, le matériau hybride est mis en suspension dans la solution tampon. Après une demi-heure d'agitation pour favoriser la dispersion de la phase [Zn-Al-Uréase], la suspension est centrifugée. Le surnageant est alors analysé comme précédemment.

Les analyses en spectroscopie UV ont confirmé la libération de l'uréase immobilisée dans les matrices HDL. Les valeurs obtenues en fonction des matrices préparées sont répertoriées dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Pourcentage de la quantité d'enzymes relarguée pour les matrices hybrides préparées par coprécipitation.**

Matrice	Q	pH	% d'enzyme relarguée
[Zn <sub>3</sub> -Al-Cl]	1/3	8	4
[Zn <sub>3</sub> -Al-Cl]	1	8	18
[Zn <sub>3</sub> -Al-Cl]	3	8	30
[Zn <sub>3</sub> -Al-Cl]	1	7	33
[Zn <sub>3</sub> -Al-Cl]	1	9	15
[Zn <sub>2</sub> -Al-Cl]	1	7,5	6
[Zn <sub>4</sub> -Al-Cl]	1	9	20

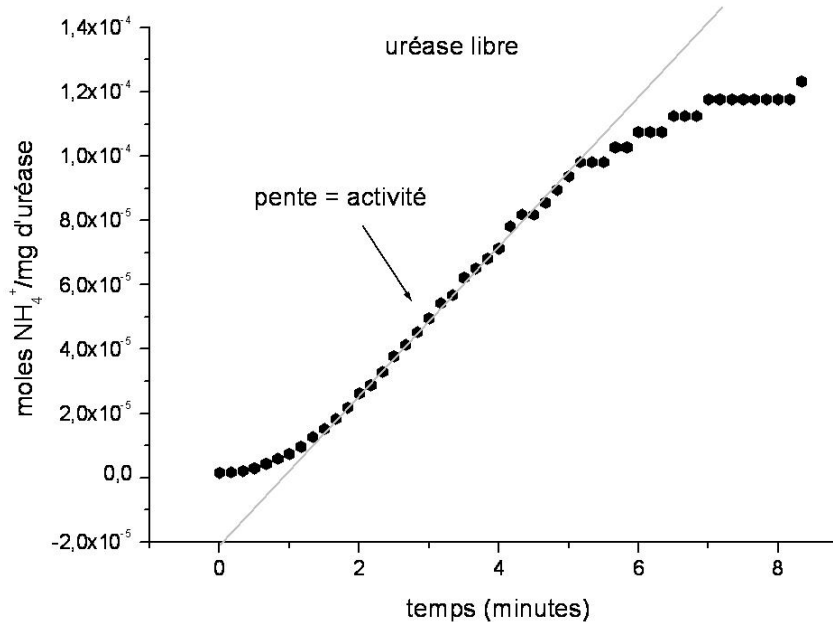
Les résultats montrent que l'uréase est faiblement retenue pour les matrices préparées à partir d'excès d'enzyme, à un pH 7 et pour un rapport  $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}=4$ . Ces phénomènes peuvent être liés à la diminution des énergies d'interactions entre l'uréase et l'HDL à pH = 7 et entre la seconde couche d'uréase et l'HDL pour Q élevé. Les résultats obtenus pour la phase [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl] confirment la forte capacité d'immobilisation de cette phase HDL qui présente la capacité d'échange anionique et la densité de charge la plus élevée.

### *II.3.2 Activité enzymatique des phases préparées par coprécipitation*

Nous avons déterminé l'activité enzymatique de l'uréase immobilisée par coprécipitation sur les matériaux fraîchement préparés, séchés par lyophilisation ou séchés à température ambiante (Ta) puis broyés. Les phases étudiées ont été préparées en fonction de Q (1/3 à 3), du pH (7 à 9) et de R (2 à 4).

L'activité enzymatique a été déterminée en traçant la courbe représentative de l'évolution de la quantité de  $\text{NH}_4^+$  en fonction du temps. La Figure 3 permet de suivre l'hydrolyse de l'urée à pH = 7,4. La pente obtenue correspond à la libération de  $22,8 \cdot 10^{-6}$  moles de  $\text{NH}_4^+$  par mg d'uréase et par minute. Suivant la définition de l'activité enzymatique de l'uréase, on en déduit que l'activité de l'enzyme libre à pH = 7,4 est de 22,8.

Les valeurs caractérisant l'activité enzymatique de l'uréase immobilisée seront données en pourcentage par rapport à l'activité enzymatique de l'uréase libre.

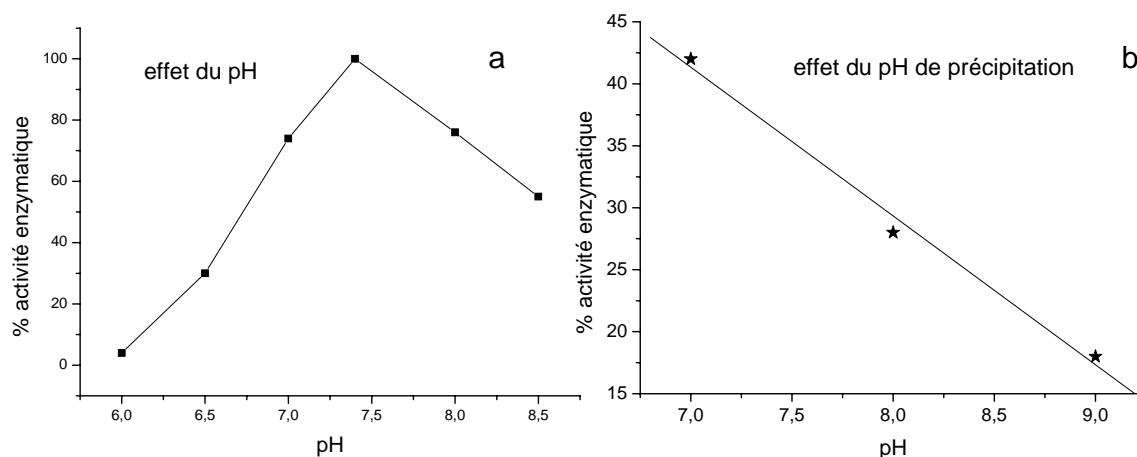


**Figure 3 : Courbe représentative de l'activité enzymatique de l'uréase libre à pH = 7,4**

L'activité enzymatique extraite à partir de la pente est similaire à celle déterminée par l'équation de Michaelis –Menten. Les valeurs de  $K_m$  de  $V_{max}$  issus de la droite  $1/t=f(1/[urée])$  sont  $0,011\text{ M}$  et  $8,34\text{ minutes}$ . D'après l'équation, la vitesse de réaction catalytique ( $V_0$ ) est  $4,8\text{ minutes}$ . Le nombre de  $\text{NH}_4^+$  si la réaction est totale est égale à deux fois le nombre de mole urée ; soit  $8,3210^{-4}\text{ moles}$ . Dans ce cas, la quantité d'uréase était de  $6,9\text{ mg}$ . On peut en déduire l'activité de la façon suivante : nombre mole de  $\text{NH}_4^+$ / vitesse de réaction/ masse d'uréase ( $8,3210^{-4}/4,8/7$ ) =  $24,8\text{ }10^{-6}\text{ moles de NH}_4^+/\text{mg/minutes}$ .

*Effet du pH :* L'effet du pH sur l'activité enzymatique de l'uréase libre (Figure 4.a) montre un maximum à  $\text{pH}=7,4$ , résultat déjà connu dans la littérature<sup>11</sup>. L'activité diminue de 26%, 24% et 45% pour des pH du milieu de 7,0, 8,0, 8,5, respectivement. Les mesures d'activité ont été effectuées à  $\text{pH} = 7,4$ . L'effet du pH de précipitation des phases hybrides sur l'activité résiduelle de l'enzyme immobilisée a aussi été représenté (Figure 4) afin d'évaluer l'impact des conditions de synthèse sur la préservation des propriétés biologiques de l'uréase.

<sup>11</sup> S. D. Cesaero, S. R. Langton, FEMS Microbio. Lett., 78(1), 1992, 15-21



**Figure 4 : Activité enzymatique a) de l'uréase libre en fonction du pH et b) de l'uréase immobilisée dans une matrice [Zn<sub>3</sub>-Al] en fonction du pH de précipitation**

L'augmentation du pH de coprécipitation entraîne une diminution drastique de l'activité due à la dénaturation de l'enzyme. Lorsque la synthèse est effectuée à pH = 9, par exemple, l'enzyme ne présente plus qu'une activité de 16% de l'enzyme libre.

Le Tableau 1 récapitule le pourcentage de l'activité de l'uréase immobilisée en fonction de l'activité de l'uréase libre.

**Tableau 2 : Pourcentage d'activité de l'uréase immobilisée par rapport à l'uréase libre**

Q	Zn/Al	pH	% Suspension fraîche	% Ta	% lyophilisation	Pm (10 <sup>-2</sup> cm/s)
1/3	3	8	16			0,7
1/2	3	8	22			0,95
1	3	8	28	3	6	1,6
2	3	8	44	9		1,3
3	3	8	62	17		1,6
1	3	7	42	6		
1	3	9	16	0,4		
1	2	7,5	21			0,78
1	4	9	32			1,7

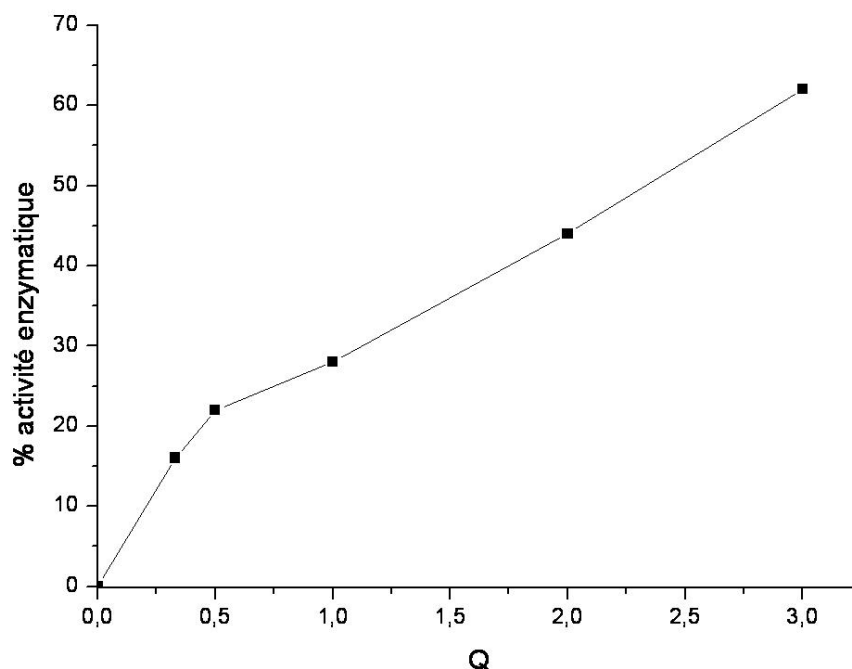
Les activités de l'uréase immobilisée sont inférieures à celle de l'uréase libre indiquant que l'immobilisation dans les hydroxydes doubles lamellaires entraîne une désactivation de l'enzyme.

*Effet du mode de séchage* : Les résultats obtenus pour une phase [Zn<sub>3</sub>-Al-Uréase] préparée à pH = 8 et pour Q=1 montrent que le mode de séchage s'avère être un facteur limitant. En effet, le pourcentage d'activité de l'uréase déterminée sur un matériau fraîchement préparé est de 28 %, alors que par lyophilisation ou séchage à température ambiante, l'activité diminue jusqu'à 6 et 3 %, respectivement. Lors du séchage à l'air, l'agrégation des plaquettes par interactions électrostatiques ou par formation de liaisons chimiques doit piéger les enzymes dans la matrice inorganique. Dans ces conditions, la diffusion de l'urée vers les sites actifs est restreinte. En modifiant le mode de séchage, il est possible de jouer sur la morphologie du matériau hybride et sur le confinement de l'enzyme. La lyophilisation est une méthode employée pour sécher un produit sans modifier ses propriétés biologiques. En outre, le matériau hybride obtenu montre une structure plus aérée (Figure 18, chapitre 4) qui devrait améliorer la diffusion. L'activité déterminée montre une légère amélioration, cependant celle-ci reste encore insuffisante. Toutefois, la déshydratation engendre le rétrécissement et la réduction de la taille des pores. Quand l'argile est réhydratée, ils ne reviennent pas à leur taille initiale et sont donc plus petits que ceux des argiles fraîchement préparées. Pour remédier à cet effet, les mesures ont été réalisées sur suspension fraîche. Dans ces nouvelles conditions, le matériau est gonflé (riche en eau) ce qui limite l'écrasement de l'enzyme et la soumission de la biomolécule à de nombreuses étapes (temps, séchage, broyage). Les résultats montrent une forte amélioration.

*Effet du rapport Q, uréase/[ZnAl]* : Un des paramètres étudiés dans le chapitre 4 concerne le rapport massique uréase/HDL. L'activité enzymatique croît avec l'augmentation de la quantité d'uréase immobilisée (Tableau 1). En outre, les mesures de perméabilité des biomembranes montrent une meilleure accessibilité de l'urée lorsque le rapport Q augmente.

La Figure 5 ci-dessous représente l'activité enzymatique en fonction du rapport Q. Deux comportements semblent être mis en évidence. Dans un premier temps, l'uréase en défaut dans la matrice inorganique montre une augmentation continue de son activité pour Q allant de 0 à 1/2. Les mesures d'activité montrent un infléchissement lorsque le rapport Q passe de 1/2 à 1. Entre Q = 1 et 3, l'activité augmente de nouveau proportionnellement avec la quantité d'uréase. Cependant, la pente obtenue à faible concentration est plus prononcée. L'uréase est plus dispersée dans le matériau et par conséquent le nombre de sites actifs est plus facilement accessible. En augmentant la quantité d'uréase, les biomolécules s'accumulent dans la matrice ce qui bloque l'accès au substrat. Cette remarque explique le comportement de l'activité pour

Q allant de 1/2 à 1. Lorsque le rapport uréase/HDL dépasse cette dernière valeur, l'enzyme s'adsorbe sur les couches d'uréase déjà formées et présente de nouveaux sites catalytiques.



**Figure 5 : Activité enzymatique en fonction du rapport massique uréase/HDL**

*Effet du rapport Zn/Al :* La Figure 6 présente l'effet du rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+}$  de la matrice HDL sur l'activité de l'uréase coprécipitée avec la phase minérale. On montre un accroissement important de l'activité biologique avec le rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+}$ . Toutefois il est difficile d'analyser ce paramètre indépendamment des autres. En effet, l'obtention d'une phase HDL avec un rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+}$  désiré nécessite d'ajuster le pH qui affecte l'activité de l'uréase. Par exemple, la coprécipitation d'une phase hybride de composition contrôlée  $[Zn_4-Al-Cl]$  doit être réalisée à pH = 9. L'activité est dans ce cas améliorée indiquant que la concentration en  $Zn^{2+}$  influe sur les propriétés de l'enzyme. D'après les mesures de perméabilité, la diffusion est améliorée lorsque le rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+}$  augmente. En outre, l'enzyme est plus faiblement liée puisque 20 % est remis en solution. Pour les phases  $[Zn_2-Al]$  et  $[Zn_3-Al]$ , 6 % et 18 % d'enzyme sont relargués de la matrice.

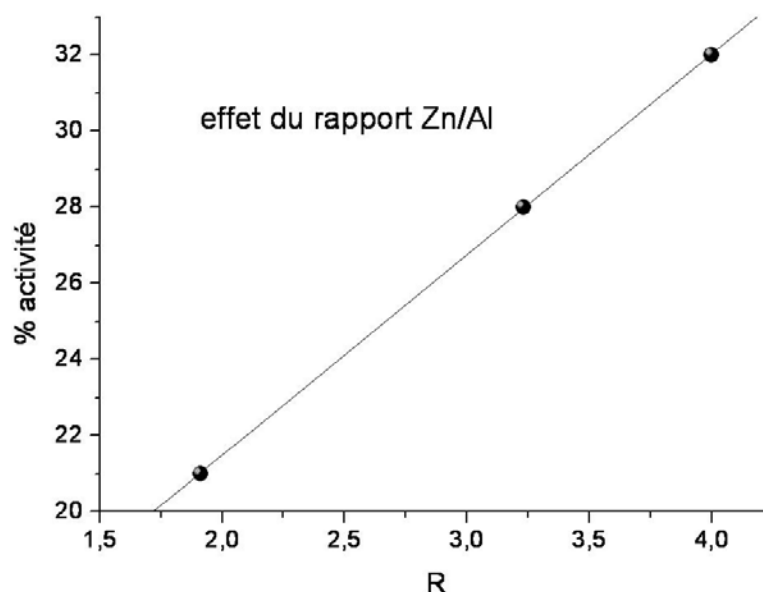


Figure 6 : Activité enzymatique en fonction de  $R$

*Effet du relargage:* Pour chaque série de matériaux étudiés en fonction de  $Q$ ,  $pH$  et  $R$ , l'activité enzymatique s'est avérée être plus importante pour les phases dans lesquelles l'uréase est faiblement liée.

Par exemple, les phases préparées à  $Q = 1/3$  et 3 relarguent 4 et 30% d'enzyme. L'activité enzymatique de l'uréase libérée représente 4% et 22% de l'activité enzymatique totale déterminée pour l'uréase immobilisée, respectivement. Plus le taux d'uréase remis en solution est important et plus sa contribution sur l'activité totale augmente. Cependant, ces observations montrent que l'activité déterminée correspond à celle de l'uréase immobilisée.

*Effet des ions métalliques :* Bachmeier et coll<sup>12</sup> ont montré qu'en présence de 5 à 100  $\mu M$  de  $NiCl_2$ , l'activité de l'uréase de *E. Coli* augmentait. Au-delà de ces concentrations, les ions  $Ni^{2+}$  avaient un effet inhibiteur. Les conditions de coprécipitations mettant en contact des concentrations variables en ions  $Zn^{2+}$  et  $Al^{3+}$ , il était important de vérifier le rôle de ces ions sur l'activité de l'uréase. Nous avons donc mesuré l'activité de l'uréase libre en présence des sels  $ZnCl_2$  et  $AlCl_3$  à 1 mM à partir de la méthode de Worthington. Les résultats n'ont pas montré d'inhibition significative de l'uréase par les ions  $Zn^{2+}$  et  $Al^{3+}$ . Pour une activité d'uréase de 53,4 unités/mg, l'activité est de 48,2 et 51,1 unités/mg en présence de  $ZnCl_2$  et  $AlCl_3$ , respectivement.

<sup>12</sup> K.L. Bachmeier, A.E. Williams, J.R. Warmington, S.S. Bang, J. Biotechnology, 93, 171-181 (2002)



### *III Réponses du biocapteur*

#### *III.1 Réalisation d'un biocapteur enzymatique*

Au delà de l'étape de préparation des matériaux bioactifs, la réalisation du dispositif global de détection reste aussi un défi technologique important. Nous présentons ici à travers la description de deux exemples de biocapteurs, les points essentiels de leur réalisation.

##### *III.1.1 Les biocapteurs à urée*

Le développement de biocapteurs à urée présente un double intérêt pour des applications dans le domaine médical et celui de l'environnement. L'urée est omniprésente dans le monde du vivant et dans l'environnement, à travers des processus naturels ou comme conséquence de certaines activités humaines. Son excès peut provoquer de graves problèmes. L'urée est un produit de dégradation du métabolisme des protéines et s'élimine dans les urines. Son dosage permet d'évaluer les fonctions rénales. En effet, un taux trop important (urémie) est lié à une insuffisance rénale qui peut provoquer une insuffisance cardiaque, une déshydratation. Dans l'environnement, il agit comme un facteur de croissance des plantes et de certaines espèces vivantes comme les poissons mais un excès bloque ce processus. Il est donc nécessaire de doser finement cette molécule pour connaître l'état du milieu dans lequel elle est présente.

Le biocapteur à urée que nous avons étudié est constitué d'un biorécepteur enzymatique, l'uréase, et d'un transducteur sensible aux variations de la composition ionique de l'électrolyte présent à son interface, ISFET (Ion Sensible Field Effect Transductor)

L'uréase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'urée selon la réaction suivante :



La réaction enzymatique provoque une consommation de protons qui génère une augmentation du pH. Cette variation conduit à une différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence, détectée par le transducteur à effet de champs ISFET.

La Figure 7 donne une représentation schématique du fonctionnement du capteur. Il est constitué d'un substrat semi-conducteur de type silicium p sur lequel repose une fine couche d'un isolant, souvent de type oxyde. Une membrane sensible est déposée sur l'isolant. Deux

régions fortement dopées appelées drain et source sont incrustées dans le substrat et sont reliées par un canal.

Le principe est le suivant : quand l'urée est en contact avec l'enzyme qui a été préalablement immobilisée sur la couche sensible, la réaction enzymatique entraîne une modification du pH due à une consommation de protons. Cette variation est détectée par une couche sensible au pH à base de nitrure de silicium, ou d'alumine et génère un changement de potentiel de surface entre l'électrolyte et la couche ionosensible. Il s'en suit une variation de la conductivité du canal (courant de drain) provoquant une variation de la tension de seuil.

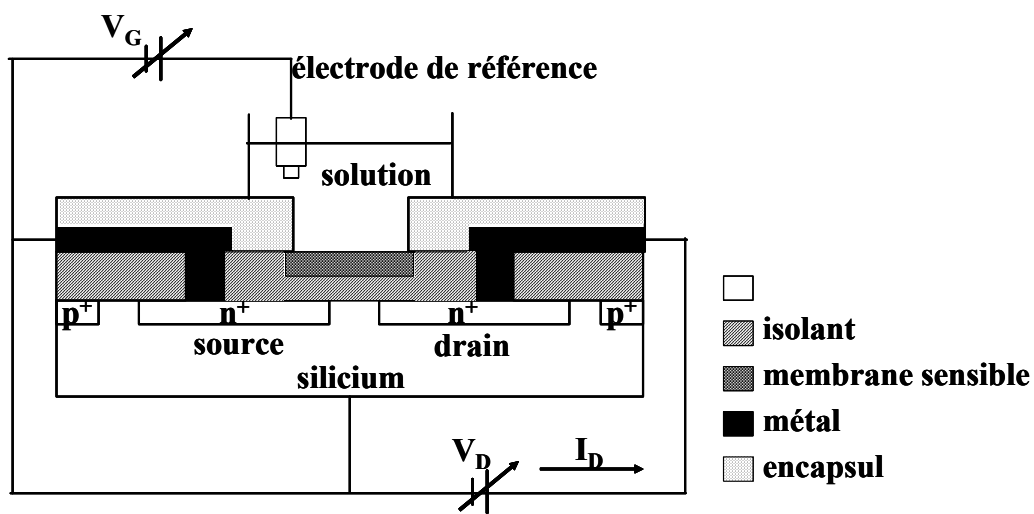
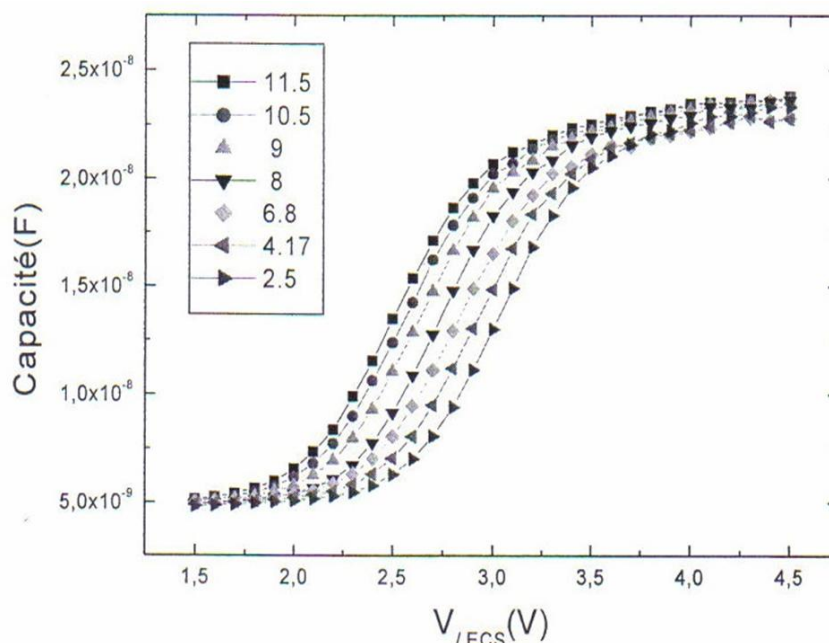


Figure 7 : Représentation schématique du biocapteur à urée

La réponse électrique du dispositif de détection peut-être représentée par la courbe donnant la capacité du circuit en fonction du potentiel (Figure 8). En fonction des propriétés électrolytiques de la solution à l'interface, la polarisation de celle-ci change ce qui se traduit par un déplacement de la position de la courbe  $C/V$  par exemple le long de l'axe des potentiels. On mesure donc cette variation de potentiel de bande plate,  $\Delta V_{FB}$ , en fonction des variations en ions déterminants ou en analyte.



**Figure 8 : Variation de la capacité de la structure Si/Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en fonction du potentiel pour une fréquence de 10 KHz, à pH variable et à T = 24°C<sup>13</sup>**

### III.1.2 Les biocapteurs à phosphates organiques

Les biocapteurs à base d'alkaline phosphatase (AP) permettent la détection directe de polluants aqueux comme les organophosphates. En effet, l'enzyme permet de catalyser l'hydrolyse de phosphomonoesters en libérant du phosphate inorganique et de l'alcool :



Cette protéine est une métalloenzyme dimère dont le site actif (un site actif par monomère) contient deux ions  $\text{Zn}^{2+}$  et un ion  $\text{Mg}^{2+}$ . Cette enzyme agit exclusivement à des pH élevés, de l'ordre de 8 et 10. La réaction enzymatique<sup>14</sup> procède à travers un intermédiaire covalent serine-phosphate et un alcool (Figure 9). Premièrement, le substrat se lie à l'enzyme libre pour former un complexe non-covalent. Puis le groupement hydroxyle du groupe Ser102 (serine), activé par un atome de zinc, exécute une attaque nucléophile sur le phosphate du substrat, qui amène à la formation d'un intermédiaire covalent phosphoseryl. Cet intermédiaire est ensuite hydrolysé par une molécule d'eau, activée par l'autre zinc provoquant la formation d'un complexe enzyme-phosphate non covalent. Finalement, le

<sup>13</sup> H. Barhoumi, DEA Physico-chimie de la matière condensée, Université du centre Faculté des Sciences de Monastir, 2002

<sup>14</sup> K. M. Holtz, E.R. Kantrowitz, FEBS Letters, 462, 7-11, 1999

phosphate est relargué du complexe et libère le site actif de l'enzyme. Le rôle du magnésium servirait à orienter la Ser102 dans une conformation activante vers le zinc. Le phosphate inorganique est aussi un inhibiteur compétitif de l'enzyme et remplit entièrement le volume superficiel du site actif.

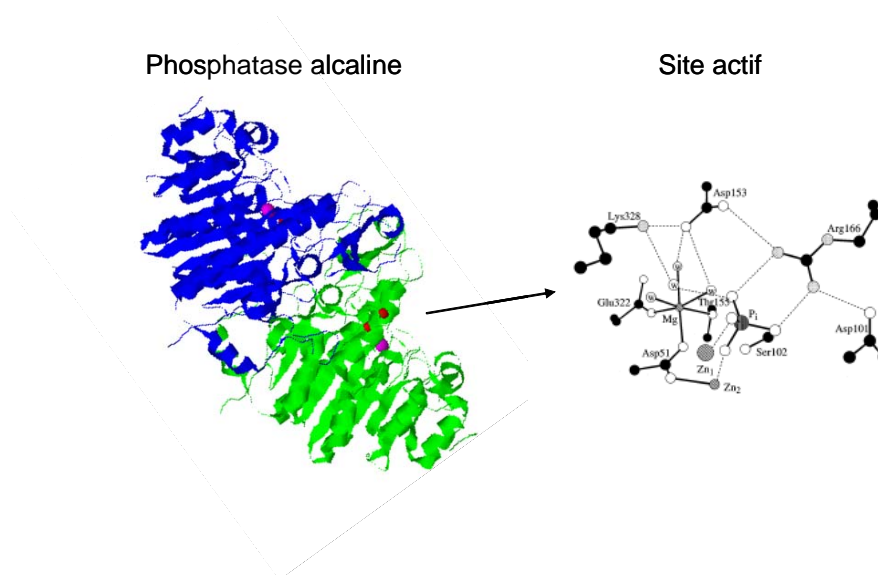


Figure 9 : Schéma représentatif de la phosphatase alcaline et de son site actif<sup>14</sup>

Les biocapteurs à base d'alcaline phosphatase reposent sur un transducteur ampérométrique. La décomposition d'un phénylphosphate entraîne la formation de phosphate inorganique et de phénol. Le phénol peut être détecté par oxydation au niveau d'une électrode indicatrice dont le potentiel est fixé. Cette réaction redox entraîne un changement d'intensité du courant qui est proportionnel à la quantité de phénol oxydé. Cependant, la passivation de l'électrode liée à la présence de phénols est un désavantage pour les performances du biocapteur. Il est préférable alors d'élaborer des biocapteurs bi-enzymatiques qui permettent d'amplifier le signal (Figure 10). Le couplage des deux enzymes peut se faire à travers des ponts avidine-biotine<sup>15</sup>. Dans ce type de configuration, le phénol libéré par l'alcaline phosphatase est décomposé en ortho-quinone par oxydation, catalysée par la phényl oxydase. La réduction de l'o-quinone en catéchol entraîne une réponse ampérométrique.

<sup>15</sup> C. Mousty, J.L. Bergamasco, R. Wessel, H. Perrot, S. Cosnier, *Analytical Chemistry*, 73, 2890-2897, 2001

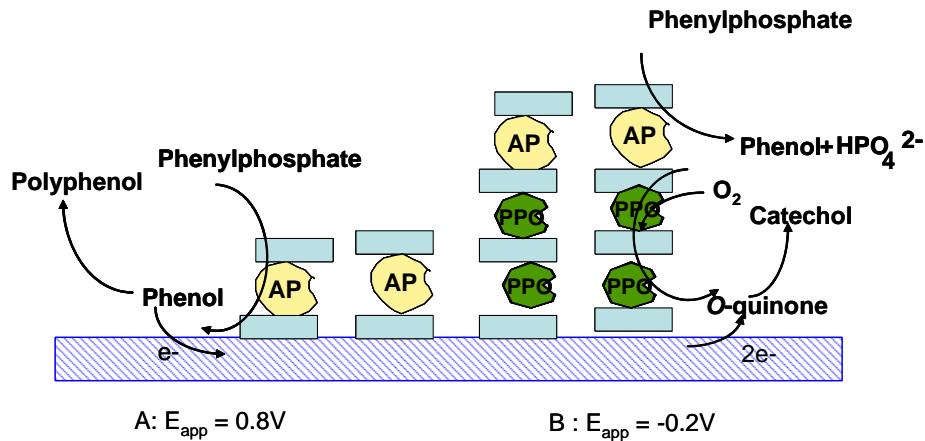


Figure 10 : Représentation schématique de la réaction enzymatique pour la détection de phénylphosphate

### III.1.3 Réponses du biocapteur

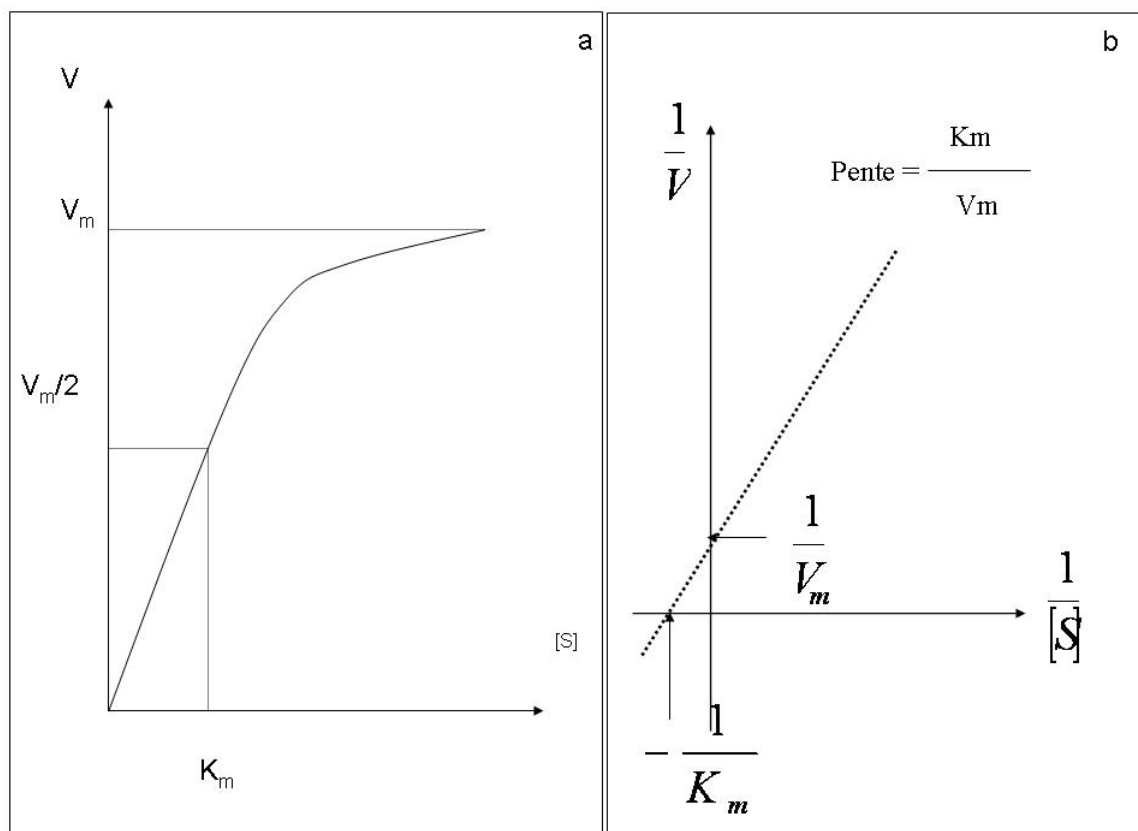
Les biocapteurs basés sur l'immobilisation d'enzyme ne sont pas stables dans le temps. Par conséquent, l'immobilisation de l'enzyme dans ces dispositifs peut améliorer la durée de vie du biocapteur.

Comme on l'a montré dans le chapitre 1, l'activité enzymatique est obtenue par la mesure de la vitesse de la réaction enzymatique à partir de l'équation de Michaelis Menten :

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_M}$$

$V_{\max}$  caractérise la vitesse maximale de la réaction enzymatique à saturation en substrat. Tous les sites catalytiques sont alors complexés et l'enzyme est sous la forme ES. La constante  $K_M$  possède les dimensions d'une concentration molaire : elle correspond à la concentration en substrat  $[S]$  nécessaire pour atteindre une vitesse réactionnelle égale à la moitié de la vitesse maximale  $V_{\max}$ .  $K_M$  représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus sa valeur est grande plus l'affinité de l'enzyme pour son substrat est faible. La courbe donnant l'évolution de  $V$  en fonction de la concentration en substrat est représentée sur la Figure 11. La détermination graphique des paramètres cinétiques à partir de cette courbe n'est pas assez précise. Les représentations linéaires sont pour cela, plus intéressantes. Notamment, le traitement de Lineweaver-Burk est obtenu en considérant l'inverse de la vitesse de réaction. La droite représentative de la fonction  $1/V=f(1/[S])$  a une pente égale à  $K_M/V_m$  et son

intersection avec l'axe des ordonnées et des abscisses permet d'obtenir les valeurs respectives de  $1/V_m$  et  $-1/K_m$ .



**Figure 11 : a) Evolution de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat avec E en excès. b) Représentation de Lineweaver – Burk**

Dans le cas de réactions enzymatiques mettant en jeu des processus redox, la vitesse de réaction enzymatique peut-être traduite par un potentiel électrochimique fonction de la concentration en substrat. C'est aussi le cas du fonctionnement des biocapteurs dont le signal de reconnaissance moléculaire est converti par un transducteur potentiométrique en signal électrique. La réponse électrique du biocapteur est mesurée sur une large gamme de concentration afin de déterminer la limite de détection et la sensibilité du dispositif.

En résumé, l'efficacité du biocapteur est définie par la sensibilité,  $K_m$ ,  $V_{max}$ , le domaine de concentration, le temps de réponse. Le Tableau 3 résume les performances de biocapteurs avec un transducteur à effet de champs, ISFET. Les résultats obtenus pourront être comparés aux nôtres puisque que le mode de préparation est presque similaire à celui que nous avons utilisé.

**Tableau 3 : Réponses de biocapteurs ISFET basés sur l'immobilisation de l'uréase**

Immobilisation	Matrice	Sensibilité mV/decade	Vmax (mV)	Km (mM)	Domaines de linéarité (M d'urée)	Propriétés du biocapteur remarques
Encapsulation Latexs biodégradables à groupement <sup>16</sup>	Hydroxyles Neutre	22 <sup>a</sup>	53,4	1,14	10 <sup>-4</sup> à 10 <sup>-1,5</sup>	La stabilité du biocapteur a montré que la réponse diminuait de 60 % pour le polymère hydroxyle alors que pour les polymères cationiques, elle diminuait de 2 %. Les tests ont été effectués dans une solution tampon à 5 mM à pH=7,4.  La faible valeur de sensibilité obtenue pour le polymère acétate peut être provoquée par la désactivation lors de l'immobilisation mais la stabilité a été améliorée en diminuant le temps le contact avec le glutaraldéhyde (réticulation).
	acétate cationique	10 <sup>a</sup> 26 <sup>b</sup>	50	1,12	10 <sup>-4</sup> à 10 <sup>-2</sup>	
	Lactobionate cationique	24 <sup>a</sup>	49,7	1,25	10 <sup>-4</sup> à 10 <sup>-1,5</sup>	
Contact avec des argiles <sup>17</sup>	Laponite cationique	53,22 <sup>c,d</sup> 27,3 <sup>b</sup> 33,82 <sup>c,e</sup> 110,6 <sup>c,f</sup>	69,5 40,5 65 93	2,8	0,005 – 0,55 0,01 – 0,65 0,05 – 0,77 0,005 – 0,5	-La réponse $\Delta$ : $\nabla$ de la durée de réticulation (diminution de l'activité ou à l'augmentation de la gêne stérique). $\nabla$ rapport massique laponite/uréase ; $\Delta$ la quantité déposée Sans glutaraldéhyde : relargage de l'enzyme en présence de tampon phosphate. Avec la matrice HDL, $\Delta$ rapport massique HDL/uréase ;  - Le temps de réponse est plus rapide (5 – 10s) avec l'HDL du à une perméabilité plus importante – laponite (1,5 et 4 min) - Maximum d'activité laponite : 35 °C, HDL : 45 °C - Stockage : HDL $\nabla$ 30 % (5j), $\Delta$ (40j), 54 % de sa réponse initiale ( 70 j), la laponite a perdu 40 % en 15 jours.
	HDL cationique	18,2 <sup>c,f</sup> 37,26 <sup>c,g</sup>	47 72	2,36	6.10 <sup>-5</sup> – 0,01 4.10 <sup>-5</sup> – 0,01	

**a** : valeur obtenue avec glutaraldéhyde (30 min), **b** : valeur obtenue avec glutaraldéhyde (15 min), **c** : valeur obtenue avec glutaraldéhyde (8min), **d** : rapport massique laponite/uréase = 1, 1 µl de dépôts, **e** : rapport massique laponite/uréase = 2, 1 µl de dépôts, **f** : rapport massique HDL/uréase = 1, 2,5 µl de dépôts, **g** : rapport massique HDL/uréase = 2, 2,5 µl de dépôts

<sup>16</sup> H. Barhoumi, N. Jaffrezic-Renault, Biosensors and Bioelectronics, 2004

<sup>17</sup> J. V. de Melo, S. Cosnier, C. Mousty, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, Analytical Chemistry, 74, 4037-4043, 2002

### III.2 Etude des biocapteurs basés sur l'immobilisation de l'uréase dans les HDL

#### III.2.1 Principe de la méthode de mesure

Les capteurs de type ISFET ou Ion-selective Field Effect Transductor sont très sensibles à toutes modifications du potentiel électrique à l'interface isolant/électrolyte générées par une réaction chimique ou biologique. Dans le cas de l'hydrolyse enzymatique de l'urée, la réaction correspond à un changement de pH :



Une courbe de calibration a été enregistrée en représentant le déplacement  $\Delta V$  en fonction de la concentration en urée (Figure 12). Dans notre étude, les mesures de capacité ont été réalisées à une fréquence de 10 kHz, pour un balayage en potentiel de -1,0 V à +2,0 V et un signal d'amplitude de 10 mV (annexe 5). Toutes les mesures ont été réalisées dans le noir pour éviter la photoinduction des charges dans le transducteur semi-conducteur.

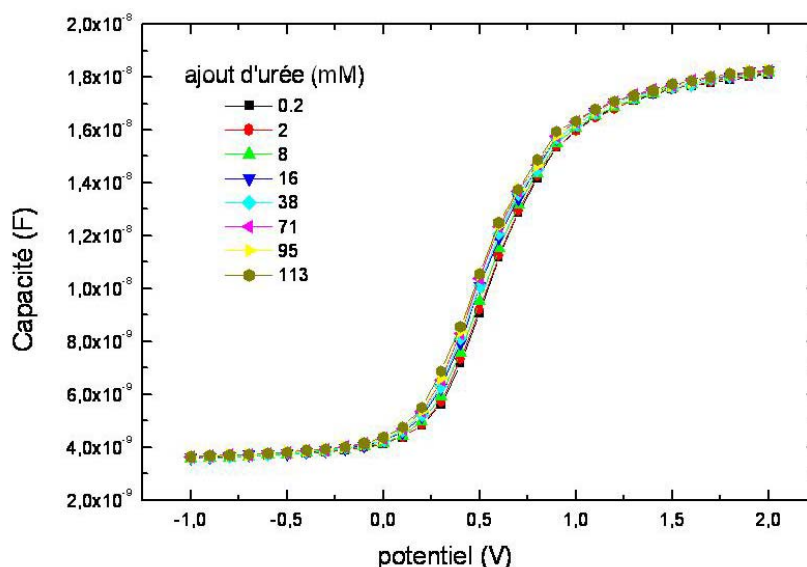


Figure 12 : Courbe  $C = f(V)$  pour un biocapteur [Zn<sub>2</sub>-Al-uréase] avec  $Q = 1/3$  élaboré par la technique Langmuir-Blodgett

Les courbes de calibration ont été obtenues à partir des réponses potentiométriques des films hybrides enregistrées dans une solution de tampon phosphate de 5 mM à pH = 7,4.



### III.2.2 Réalisation des biocapteurs

Les biocapteurs ont été réalisés par dépôts de matériaux hybrides HDL-Uréase sur la surface d'une électrode Si/SiO<sub>2</sub>/Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (1 cm<sup>2</sup>) selon les techniques de spin-coating et de Langmuir – Blodgett. Avant de mesurer les performances du biocapteur, le support modifié est stocké à 4 °C.

#### Dépôts par spin-coating :

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser à la réponse du biocapteur mesurée sur les phases préparées par coprécipitation ([Zn<sub>3</sub>-Al-Uréase] pour Q = 1/3, 2 et 3, [Zn<sub>2</sub>-Al-Uréase] et [Zn<sub>4</sub>-Al-Uréase] pour Q = 1/3).

2 g/L d'une suspension de [Zn<sub>R</sub>-Al-Uréase], préparée par coprécipitation, est dispersée par agitation dans une solution phosphate PBS (20 mM, pH = 7,4) pendant une nuit. La surface de l'électrode est recouverte par spin-coating ( $v = 1000$  rpm) en ajoutant une goutte (20  $\mu$ L) de cette suspension colloïdale. L'électrode est ensuite séchée à température ambiante pendant 30 minutes et lavée avec une solution tampon de 5 mM à pH = 7,4.

#### Dépôts Langmuir – Blodgett :

Les mesures électrochimiques ont été effectuées sur les films LB transférés sur les supports Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> hydrophile et hydrophobe. La méthode de dépôt a été décrite dans le chapitre 5. Les conditions expérimentales des films étudiés sont répertoriées dans le Tableau 4.

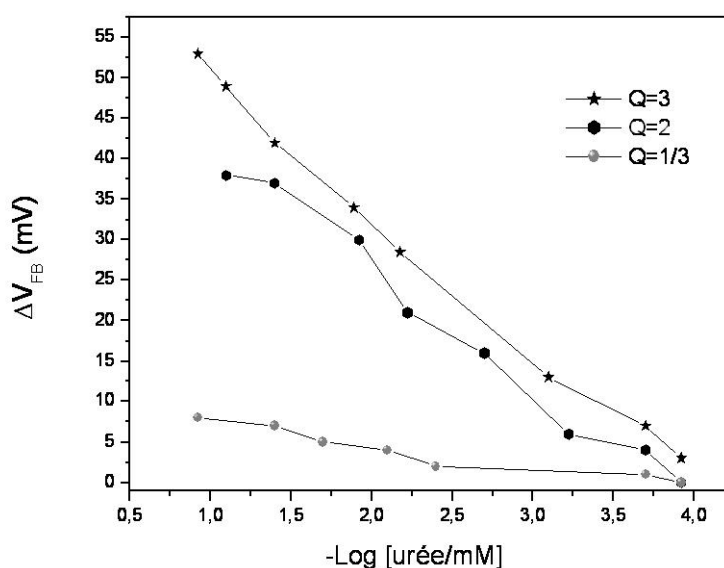
**Tableau 4 : Conditions expérimentales des films déposés sur le support**

Conditions expérimentales			
Matrice	Q	Substrat	Couches
[Zn <sub>3</sub> -Al-Uréase]	1/3	hydrophile	16
[Zn <sub>3</sub> -Al-Uréase]	1/3	hydrophile	16
[Zn <sub>3</sub> -Al-Uréase]	1/3	hydrophile	8
[Zn <sub>2</sub> -Al-Cl] 50 mg/L	1/3 3,5 mg	hydrophile	10
[Zn <sub>2</sub> -Al-Cl] 10 mg/L	3,5 mg	hydrophile	16
[Zn <sub>2</sub> -Al-Cl] 50 mg/L	1 10 mg	hydrophobe	10

### III.2.3 Réponses électriques des biocapteurs à urée

#### Dépôts par spin-coating

La Figure 13 représente le déplacement du potentiel de bande plate en fonction de la concentration d'urée. Les électrodes étudiées ont été modifiées par les phases [Zn-Al-Uréase] séchées à température ambiante pour les rapports uréase/HDL de 1/3, 2 et 3. A partir de ces courbes, la sensibilité (pente) et la réponse maximale ( $V_{\max}$ ) peuvent être déterminées (Tableau 4).



**Figure 13 : Courbes de sensibilité de la structure semi-conductrice fonctionnalisée par la matrice [Zn<sub>3</sub>-Al-Uréase] séchée à température ambiante en présence d'urée dans un tampon K-phosphate 5 mM, pH = 7.4. à différents rapports en uréase/HDL.**

Pour déterminer la constante de Mickaelis  $K_m$ , la droite  $1/\Delta V_{FB} = f(1/[urée])$  est tracée. D'après la représentation de Lineweaver-Burk, cette droite coupe l'axe des abscisses en un point correspondant à  $1/K_m$ .

**Tableau 5: Les performances des biocapteurs.**

Matériaux Hybrides HDL-Uréase – Mode de préparation									
		Suspension fraîche				Séchage à température ambiante			
Q	R	Sensibilité mV/décade	K <sub>m</sub> mM	V <sub>max</sub> mV	Domaine de concentration (M)	Sensibilité mV/décade	K <sub>m</sub> mM	V <sub>max</sub> mV	Domaine de Concentration (M)
3	3	-	-	-	4.10 <sup>-5</sup> -0,08	17	1,4	53	3.10 <sup>-3</sup> -0,11
2	3	14	1,69	45		14	2,7	37	3.10 <sup>-3</sup> -0,08
1/3	3	9	1,12	25		3	16	8	1,2.10 <sup>-4</sup> -0,11
1/3	2	-	-	-	-	4	12	6	1,2.10 <sup>-4</sup> -0,08
1/3	4	-	-	-	-	12	9	19	1,2.10 <sup>-4</sup> -0,11

D'après les résultats indiqués dans le Tableau 5, les capteurs réalisés présentent une sensibilité notable pour la détection de l'urée. Les valeurs sont proches, comprises globalement entre 9 et 17 mV/décade. Les valeurs les plus faibles sont trouvées pour Q = 1/3 et R=2 et 3 respectivement quand les phases hybrides sont préalablement séchées. C'est pour ce taux de charge en uréase (Q=1/3) que l'on obtient de manière générale les valeurs les plus faibles. Le mode de préparation ne semble pas être déterminant sur la sensibilité pour les forts taux d'immobilisation d'enzyme.

Cependant, les réponses sont favorisées pour des rapports uréase/HDL élevés, pour des matériaux fraîchement préparés et en augmentant le rapport  $Zn^{2+}/Al^{3+}$ . Ces caractéristiques corroborent les résultats obtenus lors de la détermination de l'activité enzymatique des poudres de matériaux hybrides.

Les valeurs déterminées dépendent de la diffusion de l'urée vers le site actif de l'uréase. En effet, on remarque que pour les matériaux les plus perméables (Tableau 2) (Q=3, R=4, matériau non séché), la sensibilité et V<sub>max</sub> augmentent et K<sub>m</sub> diminue. Un autre paramètre peut influencer sur la limitation de la diffusion de l'urée. D'après le chapitre 2, la spectroscopie infrarouge a révélé que l'urée peut s'adsorber sur la matrice inorganique. De ce fait, il est possible que le substrat s'accumule sur le matériau et par conséquent la vitesse d'hydrolyse est ralentie traduisant une diminution de l'activité. La diminution de V<sub>max</sub> peut être

expliquée en supposant que l'immobilisation affecte la structure tertiaire de l'enzyme donc réduit son activité catalytique ou qu'une fraction de l'enzyme est dénaturée lors du processus d'immobilisation.

En outre, la biomembrane avec une augmentation de la quantité d'uréase améliore le domaine de concentration de  $3 \cdot 10^{-3}$  - 0.1 M pour  $Q = 1/3$  à  $10^{-4}$  - 0.1 M pour  $Q = 3$ .

### Dépôts de Langmuir – Blodgett

Les mesures électriques effectuées ont été déterminées à partir de films LB [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl]-Uréase et des films [Zn<sub>3</sub>-Al-Uréase] (Tableau 6).

**Tableau 6 : Réponses du biocapteur en fonction de la nature du substrat, du mode de préparation et du nombre de couches**

Conditions expérimentales				Reponses du biocapteur			
Matrice	Q	Substrat	Couches	Sensibilité mV/decade	K <sub>m</sub> (mM)	V <sub>max</sub> (mV)	Domaine de Concentration (M)
[Zn <sub>2</sub> -Al-Cl] 50 mg/L	1 10 mg	hydrophobe	10	5	6	13	$1,2 \cdot 10^{-4}$ -0,04
[Zn <sub>2</sub> -Al-Cl] 50 mg/L	1/3 3,5 mg	hydrophile	10	11	1,2	37	$1,2 \cdot 10^{-4}$ -0,11
[Zn <sub>2</sub> -Al-Cl] 10 mg/L	3,5 mg	hydrophile	16	8	4	27	$0,4 \cdot 10^{-4}$ -0,08
[Zn <sub>3</sub> -Al-Uréase]	1/3	hydrophile	16	5	0,5	16	$0,4 \cdot 10^{-4}$ -0,04
[Zn <sub>3</sub> -Al-Uréase]	1/3	hydrophile	16	15	0,28	38	$0,8 \cdot 10^{-4}$ -0,05
[Zn <sub>3</sub> -Al-Uréase]	1/3	hydrophile	8	12	0,7	25	$0,8 \cdot 10^{-4}$ -0,05

Les caractéristiques déterminées sur un substrat hydrophile ont montré de meilleures performances. Cela peut être lié à la couche supplémentaire ajoutée lors de l'ajout d'OTS pour les surfaces hydrophobes qui peut limiter la détection des ions H<sup>+</sup> près de la surface de l'électrode.

D'après la littérature, la réticulation de l'uréase dans une vapeur de glutaraldéhyde permet de stabiliser la biomolécule dans la matrice inorganique. Une fois les films hybrides  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ -uréase déposés en plusieurs couches sur le substrat, ce dernier est placé dans une vapeur de glutaraldéhyde pendant plusieurs minutes. Les caractéristiques du substrat et le temps de réticulation sont présentés dans le Tableau 7. Des tests ont alors été effectués pour déterminer l'influence de la réticulation sur la réponse du biocapteur. Les résultats montrent qu'aucune détection n'est enregistrée dans ce cas.

**Tableau 7 : Caractéristiques de substrat modifié par le transfert de films  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$ -Uréase et temps de réticulation**

Nature du substrat	Concentration d'argile (mg/L)	Q	Nombre de couches	Réticulation (minute)
hydrophobe	100	1	10	15
hydrophile	50	1/5	12	8

Cependant, il est difficile de conclure sur les paramètres favorisant les performances du biocapteur. En effet, le transfert de 15 couches de  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  (50 mg/L,  $Q=1/3$ ) sur une électrode hydrophile n'a montré aucun signal. Les biocapteurs basés sur l'immobilisation d'uréase avec les hydroxydes doubles lamellaires par la méthode Langmuir - Blodgett ne manifeste pas une bonne reproductibilité probablement due à une mauvaise reproductibilité des films formés à la surface air-eau et des transferts.

Les biomembranes des phases coprécipitées montrent une nette amélioration de la sensibilité dans un domaine de linéarité  $0,8.10^{-4}$ -0,05 et de  $V_{\text{max}}$  lorsque l'on augmente le rapport Q (Tableau 6). L'ajout du nombre de couches entre 8 et 16 améliore la diffusion de l'urée et engendre une sensibilité plus élevée. Pour comparaison, les performances des biocapteurs préparés à partir des phases coprécipitées montrent des valeurs assez proches de celles obtenues par adsorption. Cependant, il est apparu que ces biocapteurs montraient une meilleure reproductibilité puisque pour chaque analyse un signal a été détecté. En outre, les résultats obtenus semblent être cohérents.

La stabilité à long terme de l'uréase immobilisée par coprécipitation a été analysée après six mois de stockage à -10 °C. L'activité de l'uréase diminue de 76 % alors que l'uréase libre stockée dans les mêmes conditions diminue de 62 %.

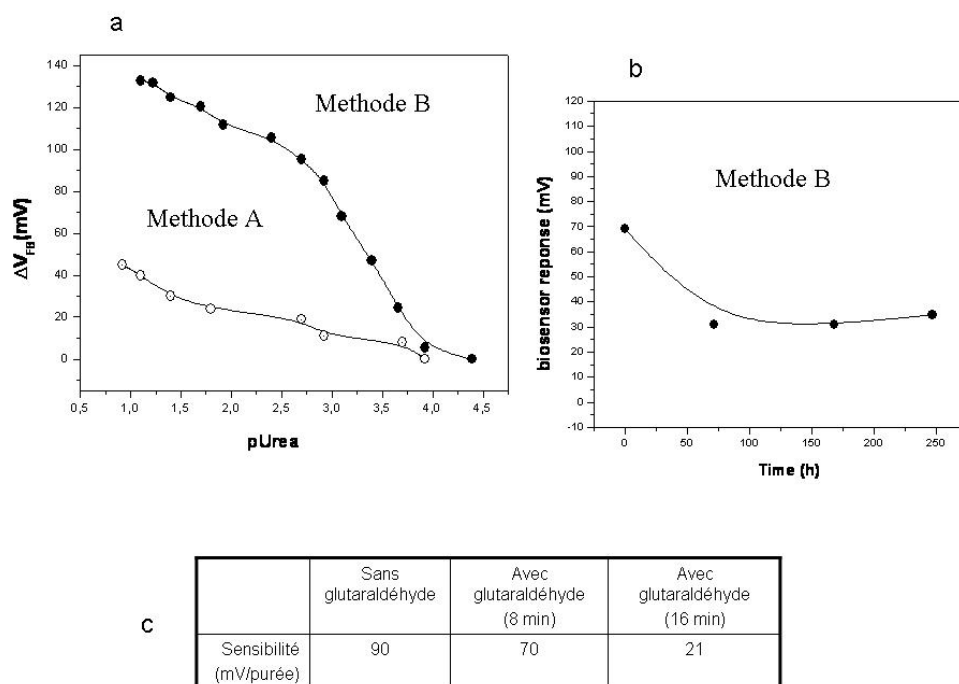
### ***III.3 Discussion***

Comparées aux caractéristiques des biomembranes décrites dans la littérature, les réponses obtenues pour nos biocapteurs sont similaires. En effet, dans le cas d'électrodes modifiées par encapsulation de l'uréase dans des latex<sup>16</sup>, la sensibilité est comprise entre 10 et 24 mV/décade dans un domaine de concentration de  $10^{-4}$  à  $10^{-2}$  M. De légères améliorations ont été observées sur des biomembranes uréase-[Zn<sub>3</sub>-Al-Cl]<sup>17</sup> pour un rapport uréase/HDL = 2. La sensibilité et V<sub>max</sub> ont été déterminés à 37 mV/décade et 72 mV, respectivement.

Une étude<sup>18</sup> a été effectuée en collaboration avec H. Barhoumi sur les performances de biocapteurs basés sur l'immobilisation d'uréase par reconstruction de plaquettes exfoliées de [Zn<sub>3</sub>-Al-DDS]. Deux voies de synthèse ont été décrites pour des rapports uréase/HDL = 1. La méthode A consiste à réempiler directement les feuillets HDL dans une solution d'uréase. Préalablement, l'uréase est dissoute dans la solution tampon à pH = 7,4. La méthode B consiste à reconstruire la matrice HDL. Après extraction de cette phase par centrifugation, elle est ajoutée dans une même solution d'uréase. Une goutte de 20 µl de solution à 1g/L de matériaux hybrides est déposée sur l'électrode puis placée dans une vapeur saturée de glutaraldéhyde pour réticuler la biomembrane. Les courbes de calibration (Figure 14.a) montrent que la méthode B est plus efficace puisque la sensibilité est 70 mV/décade après réticulation dans une vapeur de glutaraldéhyde pendant 8 minutes. Il est possible que la mise en contact de l'uréase avec le butanol entraîne la dénaturation de l'enzyme. En outre, l'uréase est soit piégée (méthode A) soit adsorbée (méthode B) dans la matrice. La présence de biomolécules à la surface de l'HDL peut favoriser la diffusion de l'urée vers les sites actifs.

---

<sup>18</sup> H. Barhoumi, A. Maaref, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrezic, C. Mousty, S. Vial, C. Forano, Science and Engineering C (MADICA 2004 Special Issue), in press



**Figure 14 : a) Courbe de calibration en fonction des deux méthodes, b) Réponse du biocapteur en fonction du temps et c) Tableau récapitulatif des sensibilités en fonction du temps de réticulation de la biomembrane<sup>18</sup>**

Le tableau de la Figure 14 indique que la réticulation entraîne une diminution de la sensibilité du biocapteur. L'urée diffuse difficilement vers les sites catalytiques. Cependant, 8 minutes de vapeur de glutaraldéhyde permettent de stabiliser le matériau. En effet, le biocapteur devient stable après 3 jours et se maintient au bout de 10 jours de stockage. Sans réticulation, le biocapteur ne montre pas une bonne reproductibilité et perd sa sensibilité après quelques jours. En général, les biomembranes non réticulées montrent une faible stabilité à long terme liée au relargage de l'enzyme dans la matrice.

Les biocapteurs réalisés par la méthode Langmuir Blodgett révèlent des performances légèrement moins bonnes que celle observées lors de transfert de deux couches d'uréase. En effet, la sensibilité de nos films est d'environ 10 mV/décade contre 24 mV/décade<sup>19</sup> dans un même domaine de concentration. Cette diminution de sensibilité peut être engendrée par le mode d'immobilisation de l'uréase dans les HDL.

<sup>19</sup> Y. Hou, Yanxia, N. Jaffrezic-Renault, A. Zhang, J. Wan, A. Errachid, J.M. Chovelon, Sensors and Actuators, B: Chemical (2002), B86(2-3), 143-149.

## *IV Conclusion*

Les tests d'activité enzymatique effectués sur les matériaux hybrides préparés par coprécipitation montrent une perte de l'activité lors de l'immobilisation de l'uréase. Ce phénomène est lié à des problèmes de diffusion de l'urée vers les sites actifs. La gêne stérique imposée par la matrice inorganique (blocage des sites actifs) ou l'affinité de l'urée pour les phases HDL affectent la vitesse de diffusion de l'urée. Pour faciliter l'accessibilité du substrat vers les sites actifs, la perméabilité de la biomembrane doit être améliorée. Les résultats ont montré que ce paramètre dépendait du mode de séchage, de la quantité d'uréase immobilisée et du rapport  $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ .

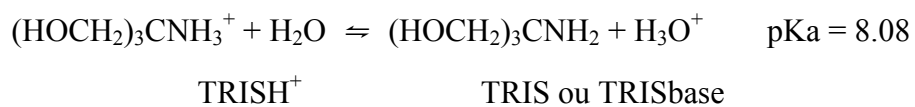
Les tests réalisés à partir des phases  $[\text{Zn}_R\text{-Al-Uréase}]$  et  $[\text{Zn}_R\text{-Al-Cl}]$  ont montré la possibilité de réaliser des biocapteurs basés sur l'immobilisation de l'uréase avec les matrices HDL. Les performances dépendent de l'affinité de l'urée avec l'uréase ( $K_m$ ) et de la conformation de l'enzyme ( $V_{\text{max}}$ ). L'augmentation de la perméabilité de la biomembrane permet d'obtenir des réponses (sensibilité,  $V_{\text{max}}$ ) plus élevées et un  $K_m$  plus petit. Le biocapteur est alors plus performant. Cependant, la technique de dépôt ainsi que le mode d'immobilisation ne montrent pas d'influence notable puisque les valeurs obtenues sont assez proches.

Cependant, les biocapteurs des phases hybrides HDL-Uréase coprécipités préparés par la technique Langmuir-Blodgett semblent être plus stables que ceux des phases adsorbées. Ceci peut s'expliquer par une meilleure reproductibilité et stabilité des films à l'interface air-eau.

La réticulation utilisée pour stabiliser la biomembrane engendre une forte diminution de la diffusion du substrat. Il est à noter que la présence d'hydroxyde double lamellaire retient fortement l'enzyme en l'absence d'anion de compensation. Pour éviter la réticulation sur nos matériaux hybrides, il serait intéressant d'utiliser une solution tampon différente. En effet, un des facteurs limitants pour nos matériaux est l'utilisation de tampon phosphate. La présence d'anions  $\text{PO}_4^{3-}$  et  $\text{HPO}_4^{2-}$  engendre le relargage de l'enzyme et diminue par conséquent la stabilité vis-à-vis de la durée d'utilisation. Il doit être nécessaire d'utiliser une solution tampon qui ne génère pas la remise en solution de l'enzyme.



Le trihydroxyaminométhane, couramment appelé TRIS est souvent utilisé par les biochimistes comme solution tampon dans les expériences. Sa zone tampon va de pH 7 à pH 9 .



Il serait intéressant de regarder l'activité de nos matériaux dans cette solution tampon.

# Conclusion



L'objectif de ce travail concernait l'immobilisation de biomolécules actives dans les Hydroxydes Doubles Lamellaires afin d'élaborer des biocapteurs pour l'analyse de polluants organiques. Cette étude a été consacrée à la préparation, la caractérisation et la mise en forme de matériaux hybrides Uréase-[Zn<sub>R</sub>-Al-Cl] et à la détermination de l'activité catalytique de l'uréase immobilisée et de la réponse des biocapteurs élaborés.

Une des particularités des matrices HDL concerne la possibilité de moduler leurs propriétés morphologiques. La méthode la plus utilisée pour préparer des Hydroxydes Doubles Lamellaires est la coprécipitation. Elle permet d'obtenir des plaquettes pseudo-hexagonales agrégées en rose des sables. Cependant, il est possible de préparer des particules individuelles plus grosses et mieux cristallisées par hydrolyse de l'urée. Notre étude a porté sur l'élaboration de la phase [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl] par décomposition de cette base en température. A partir des différents paramètres étudiés (temps, température, concentration en urée), deux tendances imposées par ce procédé sont apparues. Dans un premier temps, la précipitation de cette phase passe par la formation d'une phase d'hydroxyde d'aluminium amorphe qui tend à disparaître lors de la formation d' HDL. Au cours du mûrissement, la cristallinité de la phase HDL s'améliore. En outre, la phase [Zn<sub>2</sub>-Al-Cl] précipite puis se transforme en [Zn<sub>2</sub>-Al-CO<sub>3</sub>]. La substitution des chlores par les carbonates est observée lorsque l'avancement de la réaction d'hydrolyse montre une forte diminution de la concentration de l'urée en solution.

L'hydrolyse de l'urée à température ambiante par catalyse enzymatique permet l'obtention d'une phase [Zn-Al-CO<sub>3</sub>]. Il est à noter que le taux de précipitation et la cristallinité de ce matériau inorganique sont améliorés lorsque l'activité enzymatique est élevée. En effet, le pouvoir d'inhibition des métaux lourds diminue la vitesse de réaction de l'urée limitant la formation d'HDL. Comme précédemment, une phase d'hydroxyde d'aluminium amorphe précipite. Il est donc nécessaire de favoriser la consommation des ions OH<sup>-</sup> par les ions Zn<sup>2+</sup> en ajoutant un excès d'urée ou simplement en laissant un temps de réaction plus long. Ce procédé a été étendu à la précipitation d'autres phases telles que [Mg-Al], [Ni-Al], [Co-Al], [Cu-Cr]. La cristallinité et la pureté des phases dépendent du caractère inhibiteur des cations vis à vis l'uréase. En outre, l'adsorption de l'uréase sur ces matériaux lors de leur précipitation empêche la croissance cristalline. Les particules obtenues sont alors plus petites et moins bien définies que celles obtenues à température élevée.

La suite de l'étude a porté sur le confinement de l'uréase sur la matrice HDL. Différents procédés d'immobilisation ont été développés:

- L'adsorption a mis en évidence la forte affinité de l'uréase avec les hydroxydes doubles lamellaires. La rétention de l'enzyme sur les phases étudiées repose sur des interactions électrostatiques et de type hydrogène. Elle peut être améliorée en utilisant des phases HDL à capacité d'échange anionique et surface spécifique élevées. Cependant, la compétition avec d'autres anions empêche son immobilisation avec les feuillettes chargés positivement. Les phases carbonatées telles que  $[\text{Mg}_2\text{-Al-CO}_3]$  dont la *c.e.a* est plus importante que la phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  provoque un relargage de l'enzyme pour des concentrations élevées. En outre, l'utilisation d'une solution tampon contenant des anions phosphate entraîne soit une faible adsorption de l'uréase, soit un relargage de l'enzyme préalablement immobilisée. Le mécanisme d'adsorption propose un recouvrement des biomolécules à la surface de la matrice inorganique. En augmentant la concentration d'uréase, les phases chlorées vont se désagréger et présenter de nouveaux sites d'adsorption. La quantité d'enzyme adsorbée sur le matériau va alors augmenter. Par contre, pour les phases carbonatées, la forte affinité de ces anions avec la matrice pousse l'excès d'uréase à recouvrir la première couche d'enzymes par interactions hydrophobes. Le complexe uréase-uréase ainsi formé sera relargué en solution.

- La délamination-réempilement permet d'augmenter la surface libre des phases HDL par exfoliation des plaquettes. L'étude entreprise reste peu explorée mais présente une quantité d'enzyme immobilisée plus importante.

- La coprécipitation de  $[\text{Zn}_R\text{-Al-Cl}]$  dans une solution d'uréase a permis d'immobiliser une importante quantité d'enzyme. Cette méthode permet de maintenir la quantité d'uréase initiale pour des rapports uréase/HDL < 1. En augmentant la quantité d'uréase, le rapport Q n'est plus conservé, expliquant que dans ces conditions, l'enzyme s'immobilise sur la première couche d'uréase enveloppant la matrice inorganique. En effet, au fur et à mesure que l'on ajoute de l'uréase, l'empilement des plaquettes HDL est désordonné et le matériau se disperse dans un réseau organique. Différents paramètres tels que le rapport uréase/HDL, la densité de charge de la matrice inorganique et le pH de précipitation de la matrice ont été étudiés. Pour un pH élevé (pH=9), un rapport  $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  élevé ( $R=4$ ), les phases présentent une meilleure cristallinité. Dans d'autres conditions (Q élevée,  $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}=2$ ), une phase parasite amorphe de

ZnO a été détectée par EXAFS. Cependant, aucune conclusion sur l'influence des paramètres étudiés sur la formation de ZnO n'a pu être donnée.

L'immobilisation de l'uréase sur la matrice inorganique se manifeste à la surface des cristallites. La taille trop volumineuse de l'enzyme empêche son intercalation. Cependant, la remise en suspension dans l'eau a montré une forte rétention de l'enzyme sur la matrice HDL.

- La technique LB a mis en évidence la possibilité de transférer des particules d'HDL individuelles parallèlement à la surface d'un support. Les films stables HDL-Acide Béhénique formés à l'interface air-eau semblent favoriser un dépôt homogène. Les premiers transferts déposent les petites particules sur la totalité de la surface en contact. En augmentant le nombre de passage du substrat sur le film formé à l'interface air-eau, les plus grosses particules sont transférées. Les films formés à partir de la phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  sont plus homogènes que les films  $[\text{Zn}_3\text{-Al-Cl}]$ . En effet, la compatibilité entre l'aire moléculaire de la monocouche d'acide béhénique et la surface libre ainsi que la capacité d'échange anionique plus importante de phase  $[\text{Zn}_2\text{-Al-Cl}]$  favorisent la stabilisation du film mixte.

Cependant, les dépôts réalisés à partir de monocouches HDL-Uréase-BA sont de moins bonne qualité. En effet, l'augmentation du nombre d'interactions (HDL-BA, HDL-Uréase, Uréase-BA et Uréase-Air) provoque la formation d'un film moins stable à l'interface air-eau. Par contre, si l'enzyme est déjà piégée dans la matrice, ce problème semble s'atténuer.

L'activité enzymatique de l'uréase diminue lors de son immobilisation. Cette perte peut être provoquée :

- soit par le blocage des sites actifs engendré par une gêne stérique de l'HDL ;
- soit par l'accumulation de l'urée sur les phases HDL.
- soit par un changement de conformation de la structure 3D de l'enzyme

Pour améliorer la diffusion du substrat vers les sites actifs, la perméabilité du matériau hybride doit être améliorée. En effet, les tests effectués sur une suspension fraîche ont montré une forte évolution de l'activité. En outre, il est possible d'améliorer l'activité enzymatique en augmentant la quantité d'uréase et le rapport  $\text{Zn}^{2+}/\text{Al}^{3+}$  ou en diminuant le pH de précipitation. Afin de confirmer la stabilité de l'activité enzymatique de l'enzyme immobilisée dans la matrice HDL, des tests devront être réalisés en fonction de la température, du pH et de la durée de stockage.

Les tests réalisés à partir des supports modifiés par dépôt de [Zn<sub>R</sub>-Al-Uréase] et [Zn<sub>R</sub>-Al-Cl]-uréase par spin-coating et par la méthode LB ont montré la possibilité de réaliser des biocapteurs. Comme précédemment, la perméabilité de la biomembrane est un facteur prédominant sur les performances du biocapteurs (augmentation de la sensibilité et de V<sub>max</sub> et diminution de K<sub>m</sub>). L'augmentation de l'activité sur suspension fraîche et la mise en évidence de films [Zn-Al-uréase] stables à l'interface air-eau devrait permettre d'élaborer des biocapteurs plus performants.

En outre, le domaine de pH de précipitation des HDL est large, avec des valeurs comprises entre 5 et 10. Il est donc concevable d'adapter la matrice inorganique en fonction du pH optimal des enzymes pour conserver leurs propriétés biologiques. La suite de ce sujet se consacre à la réalisation de biocapteurs pour la détection de phosphate organique basée sur l'immobilisation de l'alkaline phosphate dans une matrice [Mg<sub>R</sub>-Al-Cl]. Cependant le coût élevé des enzymes et la faible quantité (μg) déposée à la surface des transducteurs nécessitent de travailler avec des quantités de matrices inorganiques plus petites. Les premiers travaux réalisés ont montré la possibilité de précipiter 1 mg d'HDL et d'immobiliser l'enzyme dans ces conditions.

## *Annexe*





# Annexe 1

## Techniques de caractérisations

### 1. Analyses élémentaires

L'analyse chimique des échantillons a été réalisée au Service d'Analyses du CNRS à Vernaison. Cette analyse est effectuée par spectroscopie d'absorption atomique après dissolution de l'échantillon.

### 2. Diffraction des rayons X sur poudre

Les diagrammes de diffraction X ont été effectués à l'aide d'un diffractomètre SIEMENS DATA MP D501. Ce diffractomètre se compose d'un goniomètre monté verticalement sur un générateur de rayons X KRISTALLOFLEX 800 et des infrastructures nécessaires aux mesures. Ce goniomètre positionne l'échantillon qui subit une rotation à vitesse angulaire constante.

L'appareil est équipé d'un tube à anticathode de cuivre dont le rayonnement est filtré à l'aide d'une lame en nickel. Le rayonnement X issu de ce tube est diffracté par l'échantillon puis transite à travers un monochromateur arrière à lame de graphite (la radiation sélectionnée est la transition  $K\alpha_1$  du cuivre de longueur d'onde  $\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$ ) avant d'être collecté par un compteur à scintillation de type NIM de bande passante  $0,1 \text{ \AA} - 2,7 \text{ \AA}$ .

Le diffractomètre, piloté par un ordinateur, permet l'acquisition des résultats et leur représentation graphique (positions angulaires et intensités des pics) à l'aide d'un enregistreur à tracé continu.

Les diffractogrammes de routine ont été réalisés dans les conditions opératoires suivantes :

- ✓ Domaine angulaire en  $2\theta$  :  $2^\circ - 70^\circ$
- ✓ Incrément angulaire en  $2\theta$  :  $0,08^\circ$
- ✓ Temps d'intégration par comptage : 4s

Les conditions d'acquisition des données sont un compromis acceptable entre la durée des mesures (environ 1 heure), une résolution suffisante par rapport à la largeur moyenne des raies et une bonne statistique de comptage rendue nécessaire par l'existence d'un fond continu relativement important.

### 3. Spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier

Les spectres d'absorption infrarouge ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier PERKIN-ELMER 16 PC dans une gamme de fréquences comprises entre  $400\text{ cm}^{-1}$  et  $4000\text{ cm}^{-1}$ .

Les échantillons sont conditionnés sous forme de pastilles constituées d'une masse d'environ 2 mg de poudre à analyser et de 200 mg de KBr. La résolution est de  $2\text{ cm}^{-1}$ . Le nombre d'accumulation de balayages est compris entre 10 et 15.

### 4. Spectroscopie UV-Visible

La concentration d'uréase non immobilisée a été dosée en solution dans un domaine de longueur d'onde compris entre 400 et 200 nm à l'aide du spectromètre UV/Vis Lambda 2S (Perkin Elmer)

### 5. Microscopie électronique à balayage

Les clichés de microscopie électronique à balayage ont été enregistrés à Casimir à l'aide d'un microscope LEO Stereoscan 360 à 15 kV.

### 6. Microscopie électronique à transmission

Les clichés de microscopie électronique à transmission ont été enregistrés au laboratoire de Biologie Comparée des Protistes, CNRS-UMR No.6023, Université Blaise Pascal, Aubière, France

### 7. Diffraction des rayons X

Les données de diffraction des rayons X sur poudre des échantillons 3, 4, 5, 6 ont été enregistrées à l'aide d'un diffractomètre de poudre haute résolution Philips X'Pert Pro high resolution utilisant un monochromateur de graphite de radiation  $\text{CuK}_{\alpha}$ , avec un rayon incident de masque 15 mm. Les diffractogrammes ont été enregistrés dans un domaine angulaire de  $2$  à  $70^\circ$  en  $2\theta$  avec un pas de  $0,012^\circ$  ( $2\theta$ ) et un temps de comptage de 30s par pas (48h).

## 8. Résonance magnétique nucléaire de l' $^{27}\text{Al}$

Toutes les expériences RMN ont été réalisées sur un instrument BRUCKER 300 opérant à 78,20 MHz pour la fréquence de Larmor  $\omega_0$ . La rotation de l'angle magique (MAS) est effectuée à 10 KHz, l'échantillon est introduit dans un rotor de 4 mm de diamètre. La référence utilisée est un sel  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  calibré à 0 ppm. De courts pulses de radio fréquences associés à un temps de cyclage de 500 ms ont été utilisés. Les déplacements chimiques ne sont pas corrigés du second ordre de l'interaction quadripolaire, ce qui induit intrinsèquement un décalage vers les plus faibles fréquences.

## 9. Analyse thermogravimétrique et analyse thermique différentielle

Les thermogrammes ont été enregistrés à l'aide d'une microbalance SETARAM TG-DTAA92 permettant d'opérer sous atmosphère contrôlée, en l'occurrence sous air et d'effectuer simultanément l'analyse thermo-gravimétrique et l'analyse thermique différentielle. Les essais ont été effectués sur des quantités de poudre de masse initiale 10 mg environ contenus dans des creusets d'alumine.

## 10. Spectromètre de masse couplé à l'analyse thermogravimétrique

Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées sur les gaz émis lors de l'analyse thermique avec un spectromètre de masse Quadstar 422 de chez Balzers.

## 11. Mesures texturales

Les mesures d'adsorption-desorption d'azote par la méthode BET ont été réalisées sur un SORPTOMATIC 1900 de FISONS Instruments. Avant traitement, les échantillons (quantité voisine de 400 mg) sont dégazés pendant 24 heures sous un vide de  $10^{-2}$  torr environ, à 100 °C. Des injections d'azote sont réalisées, pas à pas, de façon automatique. Leur volume est déterminé à partir de la densité du composé, prise ici pour l'ensemble de nos phases HDL égale à 2,5 g/cm<sup>3</sup>.

## 12. Spectroscopie UV – Visible sur les phases hybrides

Les mesures d'absorbance de l'uréase immobilisée sur la matrice HDL ont été réalisées avec un spectromètre d'absorption UV-visible Shimadzu UV2101 PC avec sphère d'intégration.

## 13. Perméabilité

Les mesures de Perméabilité ont été réalisées avec un potentiomètre (Autolab, PGSTAT 100, Eco-Chemie, The Netherlands). L'électrode à disque tournant est une électrode en carbone vitreux de 5 mm connecté à un Tacussel EDI 101T/CTV 101T. Une suspension colloïdale d'HDL dans de l'eau déionisée (1g/L) est dispersée toute la nuit. Une quantité définie de 20  $\mu\text{g}$  d'HDL est injectée à la surface de l'électrode. Le recouvrement est séché à température ambiante. Avant utilisation, l'électrode modifiée est incubée dans une solution de tampon phosphate pendant 20 minutes. L'électrode de référence utilisée est une électrode de  $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}_{\text{sat}}$  et la contre-électrode est un fil de platine. La sonde électrochimique correspond à 2 mM d'hydroquinone dissous dans une solution de tampon phosphate pH 7.4.

## 14. Mouillabilité

Les mesures de mouillabilités des surfaces ont été déterminées à l'aide d'un appareil Contact angle Metre GBX Scientific Instrument.

## 15. Diffraction des rayons X (Films LB)

Les données de diffraction des rayons X sur poudre des films LB ont été enregistrées à l'aide d'un diffractomètre de poudre haute résolution Philips X'Pert Pro high resolution utilisant un monochromateur de graphite de radiation  $\text{CuK}_{\alpha}$ , avec un rayon incident de masque 15 mm. Les diffractogrammes ont été enregistrés dans un domaine angulaire de 2 à 70° en  $2\theta$  avec un pas de 0,04° ( $2\theta$ ) et un temps de comptage de 8s par pas.

## 16. Microscopie à Force Atomique

Les images AFM ont été réalisées à partir d'un Microscope à force atomique (AFM) NANOSCOPE DIGITAL INSTRUMENTS.

Les analyses ont été faites en mode "*tapping*" qui est un mode oscillant (Figure 1). L'ensemble pointe-levier est forcé à une fréquence proche de sa résonance mécanique. L'image 3D de la surface s'obtient en balayant la surface à amplitude constante à l'aide du système de rétro-contrôle.

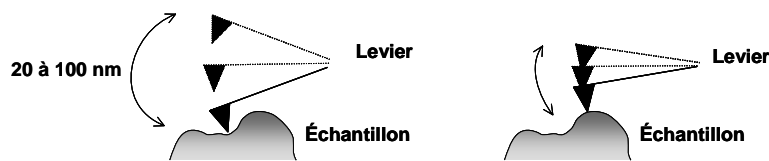


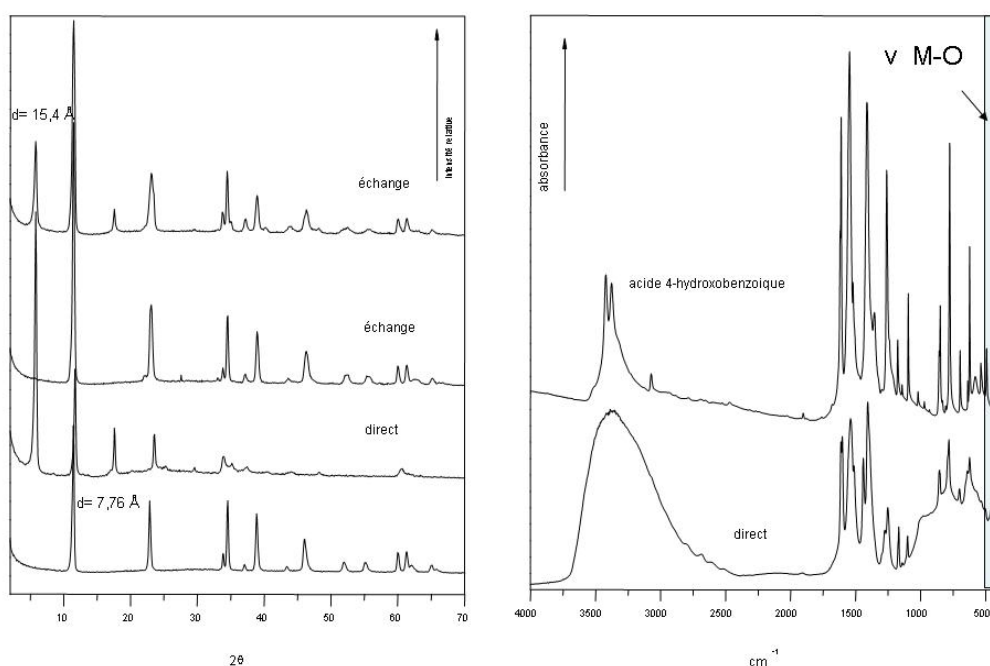
Figure 1 Schéma d'oscillation du levier



## Annexe 2

### Intercalation par la méthode urée

Nous avons réalisé un travail sur l'insertion de l'acide 4 hydroxybenzoïque directement avec la méthode urée ou par échange avec l'échantillon 4 (24h, 90°C). L'échange anionique a été réalisé pendant 24 heures à différentes températures 25 et 65 °C. L'intercalation de la molécule dont le pKa est de 4,48 a été réalisée avec succès par la méthode directe. Par contre, l'échange est plus difficile. Aucune intercalation n'a été observée à température ambiante alors qu'à 65°C elle est partielle (Figure 1). Le spectre infrarouge confirme la présence de l'acide 4 hydroxybenzoïque puisque certaines raies apparaissent sur le matériau hybride. En outre, la raie à  $427\text{ cm}^{-1}$  révèle la présence d'HDL.



**Figure 1 : Diffractogrammes des rayons X et spectre infrarouge des phases préparées**

Pour conclure, il est donc possible d'intercaler des molécules anioniques à pH faible par décomposition de l'urée en température.





# Annexe 3

## Absorption des rayons X

Depuis leur découverte en 1895 par Röntgen, les rayons X (rayons électromagnétiques) sont devenus un élément essentiel pour l'investigation de la matière. Et ceci grâce à leur capacité de traverser des matériaux et d'être absorbés différemment selon le numéro atomique, ainsi que de l'épaisseur des éléments constituant l'échantillon cible. Ils sont caractérisés par leur énergie qui s'étale sur une gamme très étendue allant de 100 à  $10^6$  eV et peuvent être classés en trois types : les rayons X classiques dont l'énergie est de l'ordre de 10 keV produits généralement dans les tubes à rayons X, ceux dont l'énergie est plus basse, sont nommés "mous" et ceux nommés "durs" sont produits généralement dans des accélérateurs de particules dont l'énergie est très élevée de l'ordre de 1,85 GeV

La longueur d'onde est reliée à l'énergie du photon par la relation :  $\lambda = hc / E$ , cette longueur d'onde décroît lorsque le n° atomique Z de la cible augmente.

En général, l'interaction des rayons X avec la matière se fait selon trois processus : absorption, émission et photo-émission.

Les photons X ont des énergies comparables à celle de liaison des électrons de couches profondes des atomes. Du fait, l'absorption des rayons X par la matière est un phénomène microscopique, on fait appel alors au formalisme quantique afin de résoudre les différents processus réalisés au cours de l'interaction. Le vecteur d'onde est lié alors à l'énergie incidente par la relation suivante  $k = (2m/h^2(E-E_0))^{1/2}$  avec m la masse de l'électron, E son énergie, et h la constante de Planck ( $6,62 \cdot 10^{-34}$  J.s).

La technique d'absorption reste un outil sélectif parfaitement adapté à l'étude de la structure locale dans les matériaux ne présentant pas un ordre à longue distance (mal défini), elle permet alors de caractériser l'environnement de l'atome sondé en précisant sa nature, le nombre des premiers voisins ainsi que la distance la séparant des atomes rétrodiffuseurs l'atome absorbeur.

### **Principe et pratique d'EXAFS.**

L'ensemble des interactions d'un rayonnement avec la matière se traduit par un effet d'absorption et de perte d'intensité du rayonnement mesuré après transmission dans un composé. L'effet d'absorption repose alors sur l'effet photoélectrique par absorption d'un photon X et excitation ou éjection d'un électron d'une couche profonde (K, L, M...) de l'atome

sondé. Le sujet de cette étude est lié à la caractérisation locale par la spectroscopie d'absorption des rayons X, dont les progrès depuis 1975 sont liés à l'utilisation du rayonnement synchrotron issu des accélérateurs de particules construits initialement pour la physique des particules élémentaires. Ces progrès ont été les plus rapides dans l'utilisation de la partie la plus simple à interpréter des spectres d'absorption des rayons X, le domaine étendu de 50 à 1000 eV au-delà des seuils d'absorption nommés EXAFS acronyme provenant de l'anglais pour (Extended X-ray Absorption Fine Structure).

## **Eléments de la théorie de l'EXAFS**

### **Principe**

L'intensité d'un rayon X, après avoir traversé un matériau, diminue en fonction de l'énergie des photons incidents. Le coefficient d'absorption linéaire  $\mu(E)$  du matériau relie l'intensité incidente et transmise par la loi de Beer- Lambert linéaire selon  $dI = -\mu \cdot I \cdot dx$ , soit par intégration,  $I/I_0 = \exp(-\mu x)$ .

Au cours de l'absorption, le mécanisme prépondérant est l'ionisation des atomes ou effet photoélectrique. La contribution de la diffusion est faible, sauf pour les éléments légers aux faibles longueurs d'onde. Globalement, l'absorption croît avec le numéro atomique des atomes excités et avec la longueur d'onde du rayonnement. Lorsque l'énergie des photons incidents atteint une valeur suffisante pour éjecter des électrons d'un type d'atome de l'échantillon (atome cible), l'absorption présente un accroissement brutal appelé seuil d'absorption. Il apparaît ainsi un seuil d'absorption pour l'excitation des électrons de chaque couche énergétique des atomes (K, L, M...). Aussi dans la région du seuil, sur quelques dizaines d'électronVolts, des transitions électroniques peuvent apparaître autour du seuil d'absorption, ils sont caractéristiques des éléments de transition, et témoignent des états accessibles dans la région du niveau de Fermi. Cette région constitue la partie XANES acronyme de (X-ray Absorption Near Edge Structure). Particulièrement sensible à l'état électronique de l'atome absorbeur, elle apporte des informations sur la nature de la cage atomique, sa distorsion (symétrie), et le degré d'oxydation.

Au-delà du seuil (sur plusieurs centaines d'électronVolts), le spectre d'absorption du rayonnement X représente la variation du coefficient d'absorption en fonction de l'énergie. Ce dernier présente de grandes discontinuités à des énergies particulières, correspondant aux énergies de liaison des électrons du solide. Elles sont associées à l'excitation d'un électron

depuis un niveau de cœur particulier vers un état vide. Ces oscillations se superposent à la décroissance monotone du coefficient d'absorption atomique  $\mu_0$  qui représente, ce que devrait être l'absorption après le seuil si l'atome cible n'était pas entouré de voisins, ce qui est le cas d'un gaz monoatomique pour lequel ces oscillations ne sont pas observées. Cette structure fine a été interprétée dans les années 1970 par LYTTLE *et al*<sup>i</sup>. Une partie de l'onde associée au photoélectron émis subit des retrodiffusions sur les atomes voisins de l'atome source. Les ondes diffusées qui reviennent sur l'atome cible avant la fin de l'excitation, interfèrent avec l'onde émise, leur amplitude s'ajoute ou se retranche de celle de cette dernière, suivant la différence de phase, donc suivant les distances des voisins.

Lorsqu'on change l'énergie incidente, on change la longueur d'onde associée au photoélectron, et donc également la phase de l'onde retrodiffusée, il en résulte des variations de l'amplitude de l'onde photoélectronique fonction de l'énergie incidente. Ces modulations du coefficient d'absorption dépendent de la distribution radiale des atomes voisins autour de l'atome cible.

La distinction entre les zones XANES et EXAFS n'est pas une frontière fondamentale, les phénomènes physiques qui entrent en jeu sont les mêmes, seule l'approche mathématique est différente.

### **Formalisme EXAFS.**

La région du spectre dite EXAFS est due à l'interférence entre l'onde émise associée à l'électron qui a subi la transition électronique et les ondes rétrodiffusées par les atomes avoisinants. Ces interférences (modulations) peuvent être décrites en fonction de l'énergie des photons incidents par la règle d'or de Fermi<sup>ii</sup> par la relation suivante :

$$\mu(E) = \left| \langle \Psi_{\text{exc}} | \xi r | \Psi_{\text{fond}} \rangle \right|^2 N_{\text{exc}}(E) \delta (h\nu - (E_{\text{exc}} - E_{\text{fond}})).$$

où  $\Psi_{\text{exc}}$  et  $\Psi_{\text{fond}}$  représente la fonction d'onde de l'état fondamental et excité,  $E_{\text{exc}}$  et  $E_{\text{fond}}$  leur énergie correspondante.

$\xi r$  est un opérateur de transition dipolaire avec  $\xi$  vecteur polarisation et  $r$  la variable de l'espace.

$N_{\text{exc}}$  : densité d'états vacants dans l'état excité.

$\delta$  : distribution de Dirac traduisant la conservation de l'énergie.

L'expression de  $\mu(E)$  montre que le coefficient d'absorption est proportionnel au carré du moment de transition.

La transition est alors non nulle sauf lorsque les relations des règles de sélection dipolaires sont vérifiées.  $\Delta l = l_{\text{final}} - l_{\text{initial}} = \pm 1$  et  $\Delta m = m_{\text{final}} - m_{\text{initial}} = 0, \pm 1$ .

Dans ce cas et si on considère uniquement la rétrodiffusion simple de l'onde associée au photoélectron et en faisant l'approximation d'une transition entre un état initial composé d'un électron dans une orbitale de type s, et d'un état final composé d'un photoélectron et d'un atome central totalement relaxé, cette partie de l'absorption peut être exprimée par la formule suivante :

$$\chi_i(k) = - S_0 \sum_j (N_j / k R_j^2) A_j(k) \exp(-2k^2 \sigma_j^2) \exp(-2R_j/\lambda(k)) \sin(2kr_j + \phi_{ij}(k)).$$

L'indice j dans la formule se réfère aux atomes diffuseurs d'une même couche à la distance  $R_j$  de l'atome absorbeur et en nombre  $N_j$ ,  $S_0$  est un facteur d'échelle représentant le nombre des photons participant au phénomène EXAFS.

$A_j$  représente l'amplitude rétrodiffusée par un atome j et  $\phi_{ij}$  correspond au déphasage total introduit par les potentiels atomiques pour une rétrodiffusion par un atome de type j et la sortie et l'entrée de l'électron dans la sphère de potentiel de l'atome absorbeur.

$\exp(-2k^2 \sigma_j^2)$ , est un terme d'amortissement représentant le désordre structural local,  $\sigma_j$  est le facteur de Debye-Waller, rendant compte des fluctuations statistiques des positions atomiques, soit par des vibrations thermiques, soit par un désordre "structural" statique autour des atomes cibles.

$\exp(-2R_j/\lambda(k))$  est un terme très sensible aux faibles valeurs de k,  $\lambda_j$  représente le libre parcours moyen de l'électron. A chaque atome diffusant j situé à une distance  $r_j$  correspond donc une fonction sinusoïdale  $\chi(k)$  de période  $2r_j$  dans l'espace k. Pour l'ensemble des atomes voisins, la somme de ces fonctions sinusoïdales produit les oscillations EXAFS. Plus la distance  $r_j$  d'un atome diffuseur est grande, plus la période  $2r_j$  dans l'espace réciproque est grande et plus l'amplitude est faible.

### **Extraction et traitement du signal EXAFS.**

L'extraction des informations structurales est basée sur la transformée de Fourier de la fonction  $\chi(k)$  permettant ainsi d'accéder à la pseudo fonction de distribution radiale des atomes autour de l'atome central pris comme référence. Le résultat est donc une distribution radiale des atomes voisins autour de l'atome central choisi. Cette distribution est

systématiquement décalée vers les courtes distances ( $\approx 0,5\text{\AA}$ ) par les déphasages  $\phi_{ij}$  qui peuvent être estimés à partir d'un composé modèle de structure connue. Le nombre de voisins  $N_j$  ainsi que les distances  $R_j$  et l'estimation du désordre  $\sigma_j$  sont ainsi accessibles à condition de connaître les fonctions de déphasage et d'amplitude caractérisant l'atome rétrodiffuseur. Ces dernières peuvent être obtenus par des données théoriques répertoriées par Teo et Lee <sup>iii</sup>, <sup>iv</sup> ou Mac Kale <sup>v</sup> ou bien expérimentalement à partir de composé référence.

Le signal EXAFS est ensuite traité en utilisant la série des logiciels d'analyse EXAFS, créée par Alain Michalowicz <sup>vi</sup>, <sup>vii</sup> (L.U.R.E. Université Paris-Sud).

### **Étapes du traitement des données de l'EXAFS.**

Nous représentons sur la figure 1 les principales étapes des traitements correspondant à l'analyse EXAFS.

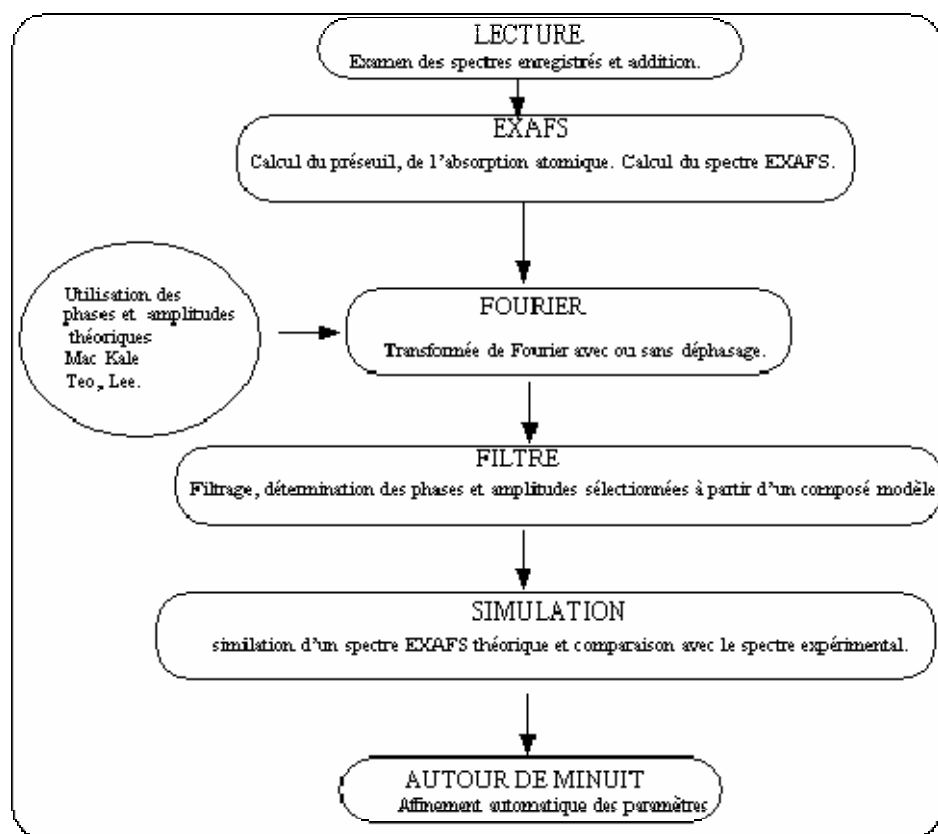
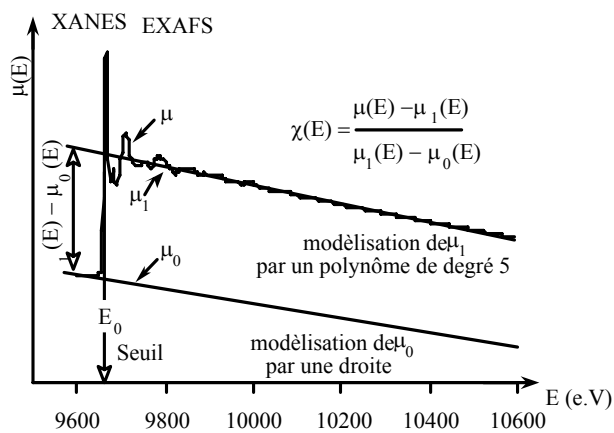


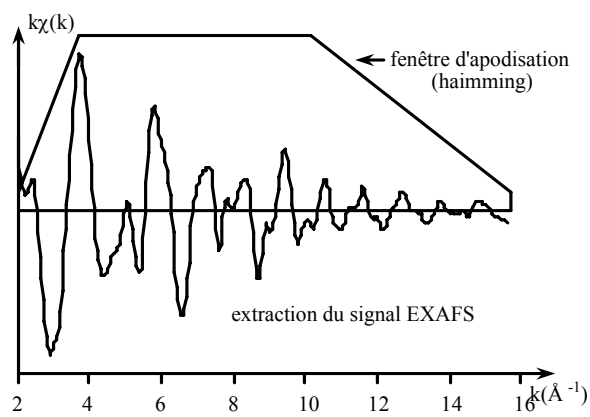
Figure 1 : Schéma des principales fonctions de la série des logiciels d'analyse EXAFS de Michalowicz pour Macintosh

**Etapes de traitement de ce travail.**

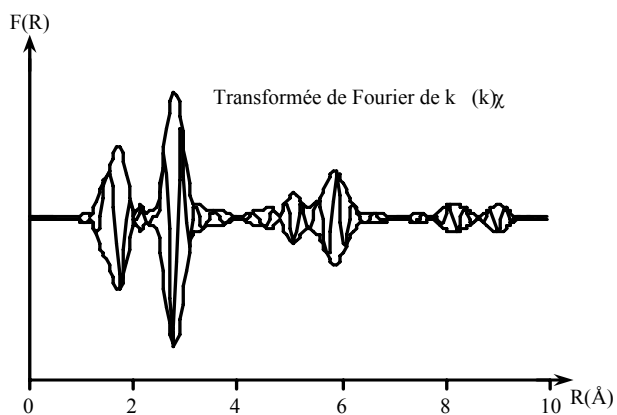
L'absorption  $\mu_0(E)$  avant seuil de l'échantillon (fond continu) est extrapolée de façon linéaire à l'ensemble du spectre, comme le montre la figure suivante



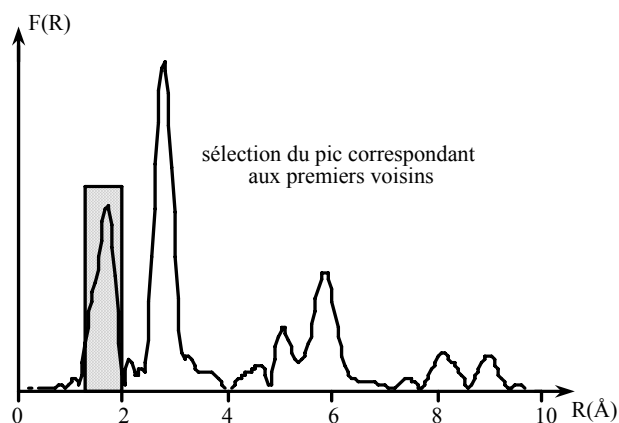
(2a)



(2b)



(2c)



(2d)

Figure 2 : Les principales étapes de l'analyse EXAFS

L'absorption atomique  $\mu_1(E)$  après le seuil est modélisée par un polynôme calculé par la méthode de moindres carrés sur un domaine choisi du spectre d'absorption.

Les oscillations EXAFS du spectre d'absorption calculées sont ensuite normalisées selon la relation  $\chi(E) = (\mu(E) - \mu_1(E)) / (\mu_1(E) - \mu_0(E))$  où  $\mu(E)$  est le spectre d'absorption mesuré. Ces oscillations peuvent contenir de basses fréquences dues à l'imperfection de la modélisation de  $\mu_0(E)$ , se traduisant dans l'espace des distances réelles par des pics parasites dans la région de 0 à 1 Å, et doivent donc être filtrées. Le signal EXAFS est ensuite pondéré par une fenêtre d'apodisation  $W(k)$  (fenêtre Keiser par exemple) sélectionnant la région du spectre à traiter. Afin d'avoir une bonne précision sur les distances interatomiques, il faut choisir un intervalle  $\Delta k$  le plus étendu possible (figure 2.b). Le module de la transformée de Fourier de  $W(k).k\chi(E)$  donne alors une distribution de la densité électronique radiale autour de l'atome sondé dont les pics présentent un décalage en distance de l'ordre de 0,5 Å dû au déphasage  $\phi_{ij}(k)$  dans l'expression de  $\chi(E)$  (figure 2.d).

La simulation des oscillations EXAFS d'une couche atomique donnée autour de l'atome cible est effectuée en sélectionnant le pic correspondant à cette couche (figure 2.c), les oscillations obtenues après calcul de la transformée de Fourier "inverse" de ce pic (figure 2.e) sont modélisées en utilisant les fonctions de phase et d'amplitude théoriques de Mac Kale.



**Données d'absorption X**

Partant de la forme brute des fichiers de mesure, constitués d'une liste de triplets  $E(\text{eV})$ ,  $I_0$ , et  $I$  nous avons appliqué les traitements suivantes :

$$\text{calcul de } \mu(E) = \lg(I_0/I)$$

$$\text{calcul de } \chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_1(E)}{\mu_1(E) - \mu_0(E)}$$

$$\text{calcul de } k(E) = 2\pi (2m/h^2(E-E_0))^{1/2}$$

L'absorption de l'échantillon avant le seuil  $\mu_0(E)$  est extrapolée sur tout le spectre par une fonction linéaire. L'absorption atomique de l'élément absorbant  $\mu_1(E)$  est calculée par un polynôme de degré 5. Les courbes tracées présentent  $k\chi(k)$  en fonction de  $k$ .

Les mesures d'absorption X sont effectuées au ELETTRA à Trieste. Le montage d'absorption X se compose essentiellement d'une source blanche de rayons X (rayonnement synchrotron), d'un monochromateur à double réflexion de Bragg, de deux détecteurs (chambres à ionisation) pour mesurer les flux de rayons X,  $I_0$  et  $I$ , respectivement, avant et après l'échantillon et enfin d'un système de pilotage et de stockage informatisé (Figure 2).

Le faisceau synchrotron (longueur d'onde critique 3,6 Å) est créé par le rayonnement de freinage de positrons de 1,85 GeV et d'une intensité moyen de 250 mA, tournant dans l'anneau à une vitesse très proche de celle de la lumière.

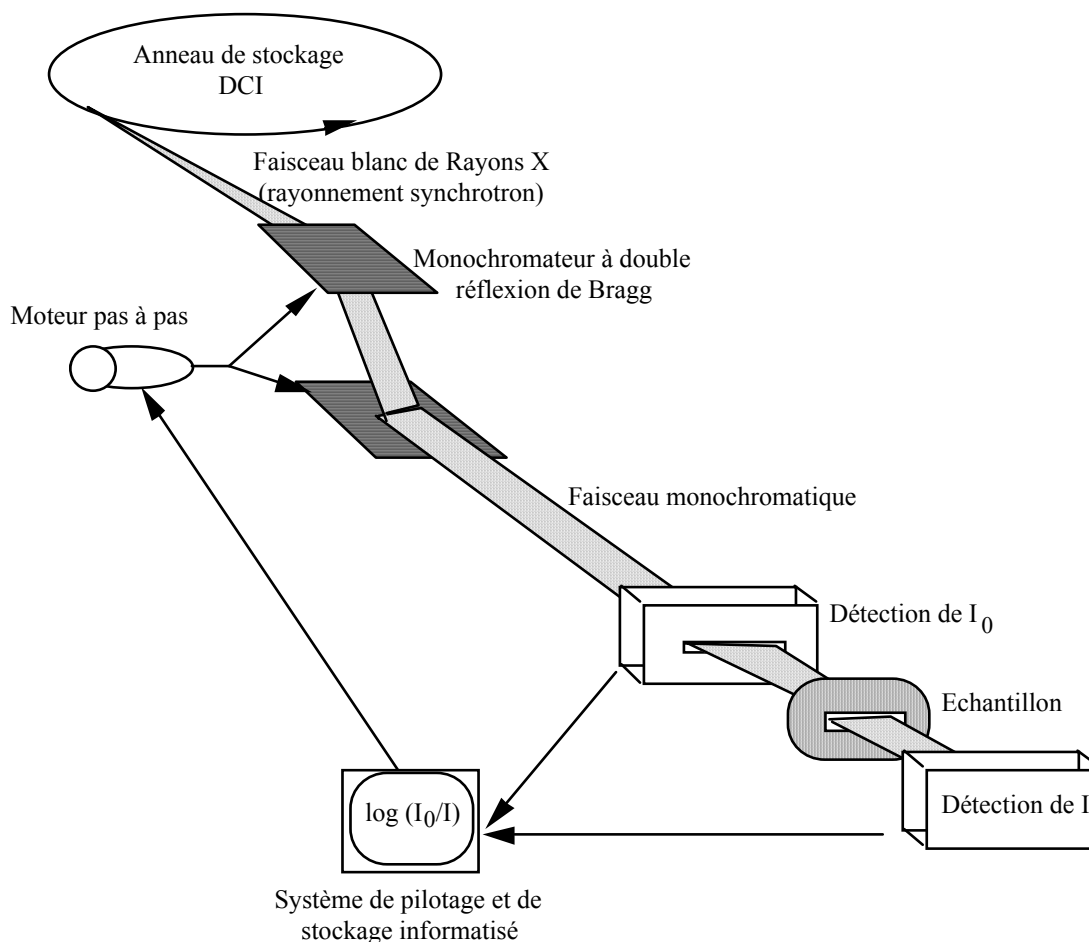


Figure 3 : *Schéma simplifié du montage d'EXAFS en transmission*

Le faisceau monochromatique est obtenu par une double réflexion de Bragg sur deux cristaux dont les faces correspondent à des plans denses d'un réseau cubique de type diamant, le choix de ces cristaux dépend du domaine d'énergie dans lequel on souhaite travailler. Les cristaux de silicium Si (311) et Ge (400) ont été utilisés pour effectuer les mesures d'absorption X de ce travail. Le domaine d'énergie accessible au moyen de ces cristaux s'étend de 3981 eV à 31200 eV, quand l'angle  $\theta$  de Bragg varie de 7 à 72 degrés.

La détection des intensités incidentes et transmises se fait grâce à des chambres d'ionisation dont il est possible de contrôler l'atmosphère en composition (air, argon, mélange hélium néon, ...) et pression.

Il est possible d'effectuer des mesures à basse température en adaptant un cryostat à ce montage. Le cryostat utilisé dans ce travail est du type à circulation d'azote liquide la température est de l'ordre de 77 K. Le compartiment échantillon est isolé de l'extérieur par une enceinte externe maintenue sous vide primaire. Un système électronique rassemble les

appareils de mesure et de contrôle (régulation, chauffage, température, positionnement des échantillons, vide..)

### **Préparation de l'échantillon**

La mise en forme des échantillons pulvérulents est d'une grande importance pour réaliser des mesures d'absorption X fiables, nous avons réalisé la dispersion de l'échantillon dans un liant inerte. Le liant utilisé est l'acide borique ( $H_3BO_3$ ) ou la cellulose qui présente l'avantage d'être peu absorbant, de ne pas réagir avec nos échantillons et de donner par pressage des pastilles de bonne tenue mécanique. Pour éviter les inhomogénéités susceptibles de conduire à une estimation erronée du signal I et par suite de l'amplitude relative des oscillations EXAFS, il convient d'effectuer un mélange très soigneux entre l'échantillon et le liant. La présence de trous dans l'échantillon conduit à la transmission d'une fraction du signal  $I_0$  sans absorption, donc à un effet similaire à un taux d'harmoniques. L'épaisseur optimale des échantillons est évaluée par EISENBERGER (1981) de façon à obtenir un signal EXAFS le plus intense possible, tout en conservant un rapport signal sur bruit convenable après le seuil d'absorption.

---

<sup>i</sup> F. W. Lyttel, D. E. Sayers and E. A. Stern, *Phys. Rev*, B, 1975, 11, 4825.

<sup>ii</sup> D. C. Koningsberger, R. Prins, "X-Ray. Absorption. Principales, Applications, Technique of EXAFS, SEXAFS and XANES" Wiley- Intersciences ed, 1988.

<sup>iii</sup> B. K. Teo, P. A. Lee, A. L. Simons, P. Eisenberg, B. M. Kinkoid, *J. Am. Chem. Soc*, 99, 1977, 3854.

<sup>iv</sup> B. K. Teo, "EXAFS : Basic Principales and Data analysis" ed Springer-Verlag, Berlin, 1986.

<sup>v</sup> A. G. Mac Kale, G. S. Knapp, S. K. Chan, *Phys. Rev*, B 33, 1986, 831.

<sup>vi</sup> A. Mickalowicz, dans "Logiciels pour la chimie", Ed. Société Française de Chimie, Paris (1991).

<sup>vii</sup> A. Michalowicz, Round Midnight, EXAFS Signal Treatment and refinement Programs, LURE, Orsay, France, Programs available on LURE Web site ; <http://www.LURE.fr>

# Annexe 4

## La technique LB

### Appareillage

Une solution d'argile est déposée dans une cuve Langmuir Through. Les films Langmuir ont été réalisés par compression de barrières monitorée à l'aide d'un logiciel de NIMA (model 611 avec un secteur efficace de film 30 centimètres x 10 centimètres).

Les pressions de surface ont été mesurées en employant une balance de Wilhelmy, qui a été équipée d'une bande de papier de chromatographie suspendue à l'interface de l'air-eau. La sous-phase a été thermostatée à  $20 \pm 1$  °C par un système thermostatique (Julabo-F25, France).

Les transferts ont été effectués sur deux types de substrat, un substrat en or (Au) et un substrat en nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), rendus hydrophiles ou hydrophobes par des traitements appropriés

### Le substrat en or

Les substrat en or proviennent du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) à Toulouse. Ils sont fabriqués en utilisant les technologies standards. La structure étudiée est constituée par une plaque monocristalline de silicium de type p, d'orientation (100), oxydé thermiquement afin d'obtenir une épaisseur  $\text{SiO}_2$  de 800 nm. Puis, une couche de titane de 30 nm d'épaisseur et finalement une couche d'or d'épaisseur de 300 nm sont déposées par évaporation sous vide.

### Substrat $\text{Si}_3\text{N}_4$

Le système ISFET sensible au pH ( $\text{Si}/\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ ) a été acheté à l'institut de Microtechnology de l' Université de Neuchatel (Suisse). La structure étudiée est constituée par une plaque monocristalline de silicium de type p, d'orientation (100), d'une couche  $\text{SiO}_2$  d'épaisseur 400

$\mu\text{m}$  et de résistivité  $10 \Omega.\text{Cm}$ , recouverte d'une couche de nitrure de silicium de 100 nm déposée par LPCVD. Le contact ohmique a été obtenu par déposition de mélange gallium-indium (3/8-5/8) du côté opposé des structures Si/SiO<sub>2</sub>/Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.

Protocole expérimental de nettoyage des substrats : Dans un premier temps, la surface du substrat est nettoyée puis fonctionnalisée. Le support en or est préalablement nettoyé à l'acétone pour éliminer les traces de graisses, séché sous azote. Il est ensuite mis dans une solution de pyrana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7 :3) et rincé à l'éthanol. Après toutes ces étapes, la surface du substrat est propre et hydrophile. Pour la rendre hydrophobe, on laisse le support 16 heures dans une solution d'ODT (1 octadecanethiol, 1 mM) dissous dans de l'éthanol.

Le traitement de la surface en nitrure de silicium commence par un nettoyage à l'aide de trois solvants organiques (trichloroéthylène, acétone, isopropanol), dont le but est d'éliminer les graisses et les poussières. Un rinçage à l'eau ultra-pure suivi d'un traitement par mélange sulfochromique est nécessaire pour créer le maximum de sites silanols ou de sites silylamines selon la réaction donnée dans la figure 1.

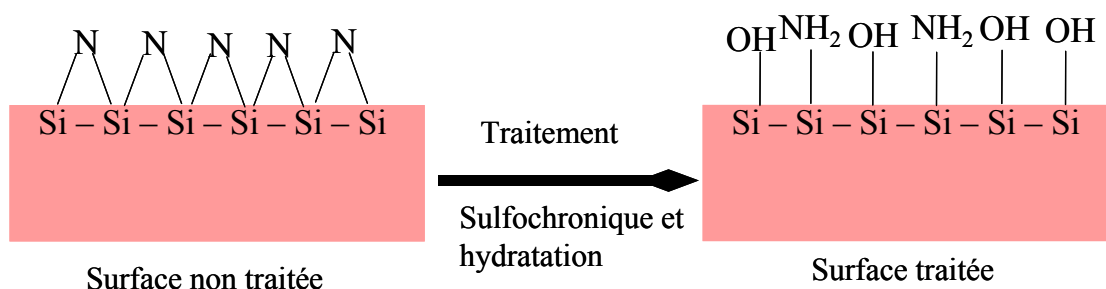


Figure 1 : Schéma représentant les groupements de surface avant et après traitement

La mesure de mouillabilité confirme le caractère hydrophile du substrat avec un angle de contact de  $3^\circ$  (Figure 2).

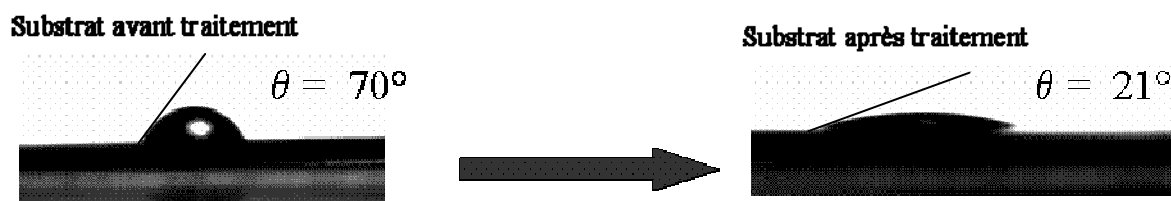
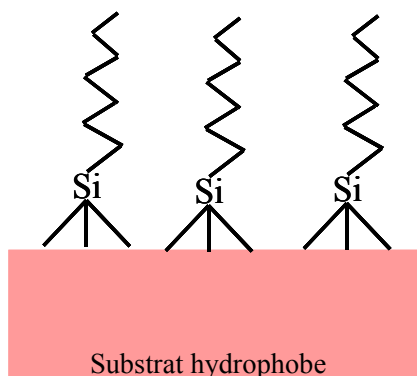


Figure 2 : Mesures de mouillabilité sur la surface avant et après traitement avec l'acide sulfochromique

Pour obtenir un substrat hydrophobe (Figure 3), il est laissé 2 heures dans une solution D'OTS (octadecyltrioxysilane) dissous dans du tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ), séché sous  $\text{N}_2$  puis mis à  $100^\circ\text{C}$  pendant 1 heure.



**Figure 3 : surface hydrophobe**



# Annexe 5

## Réponses du biocapteur

La technique retenue pour l'étude électrique des structures (electrolyte-isolant-semi-conducteur) est la mesure d'impédance électrochimique. Cette méthode non destructive, permet de mesurer l'impédance de la structure à différents régimes de polarisation. Il est possible d'estimer la réponse à un ion du dispositif, par déplacement de la bande plate avec la concentration de l'ion à détecter.

Le dispositif utilisé au cours de notre travail, est un montage électrochimique classique à trois électrodes. Le potentiel de la structure, imposé au moyen d'une contre électrode de platine de surface  $0,3 \text{ cm}^2$  de surface, est mesuré par rapport à une électrode au calomel saturé. Le dispositif expérimental est montré sur la Figure 1. Les acquisitions d'impédance sont effectuées avec un catalyseur d'impédance (VOLTALAB 40) Radiometer-Analytical. Cette acquisition est contrôlée par un ordinateur occupé d'un logiciel spécifique fourni par la même société.

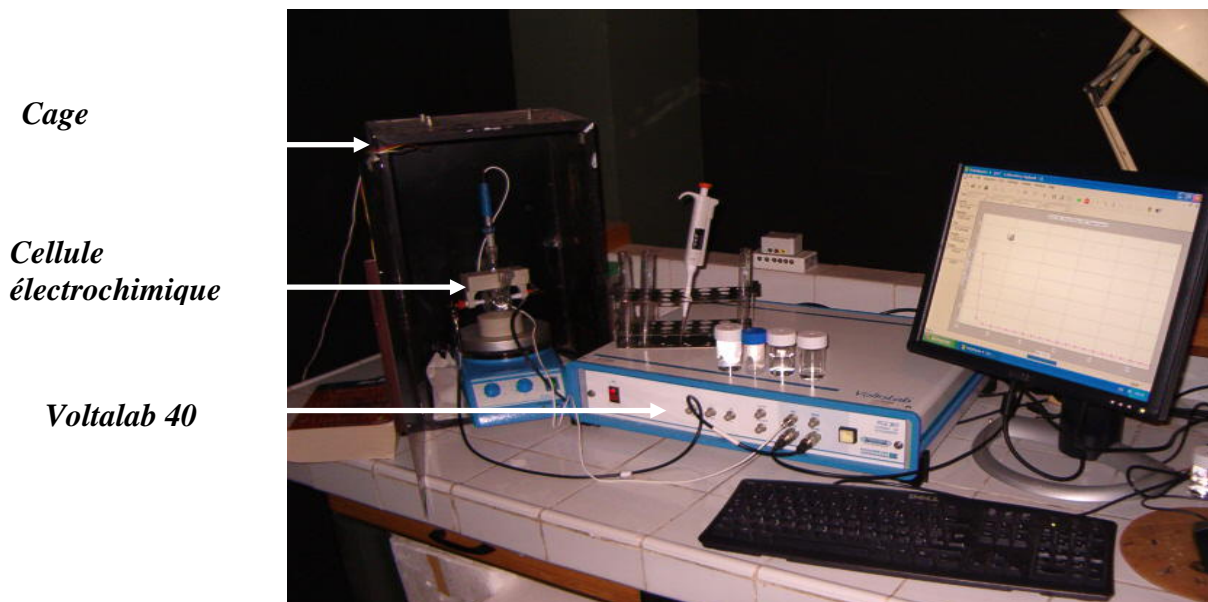


Figure 1 : Photo du dispositif de mesure d'impédance électrochimique





## Résumé

La détection spécifique de molécules est un challenge important pour le diagnostic médical, la qualité des eaux naturelles... Le dosage de l'urée permet par exemple d'apprécier les fonctions rénales et de prévenir des insuffisances rénales voire cardiaques. Les biocapteurs, en tant que dispositifs biotechnologiques de contrôle, permettent ce type de détection. La composante biologique permettant d'élaborer un biocapteur sensible à l'urée est une enzyme : l'uréase. Cependant, son instabilité et son coût élevé nécessitent l'immobilisation dans une matrice solide afin de maintenir son activité et sa stabilité. Les Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL), de structure bidimensionnelle, sont des matériaux attractifs grâce à leur stabilité thermique, leur inertie chimique, et leur faible coût. Leur structure en feuillets (chargés positivement) confère aux HDL une importante capacité d'échange anionique et une aptitude à intercaler et à stabiliser une large variété d'espèces, en particulier des macromolécules anioniques comme les enzymes. En outre, leurs conditions de synthèse par Chimie Douce favorisent les interactions avec l'uréase, la préservation de l'enzyme et donc de son activité. Les matériaux hybrides bioinorganiques ainsi constitués forment une nouvelle classe de matériaux à l'interface entre la biologie et la science des matériaux.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés, en premier lieu, à l'élaboration de la matrice hôte [Zn-Al] par hydrolyse thermique de l'urée. Trois paramètres ont été étudiés : la température, la concentration en urée et le temps afin de mieux appréhender leur influence sur la formation et la composition du matériau. Les produits obtenus lors de ces différentes synthèses ont été caractérisés d'un point de vue structural (DRX, IR, RMN de l'Al<sup>27</sup>) et d'un point de vue morphologique (MEB, MET couplé EDX). Une nouvelle voie de synthèse d'HDL a été mise au point, utilisant la décomposition catalytique de l'urée par l'uréase. Les paramètres influençant la synthèse ont pu être classés en fonction de leur efficacité de la façon suivante : activité enzymatique > concentration d'urée > temps de réaction > concentration d'enzyme (uréase).

La stratégie de confinement développée repose sur 3 méthodes : l'adsorption ou l'échange anionique d'uréase sur le précurseur HDL, le confinement par précipitation d'HDL en présence d'uréase et l'exfoliation des plaquettes HDL autour de l'enzyme. Les matériaux hybrides obtenus ont été caractérisés par EXAFS et UV solide en sus des techniques citées précédemment. L'immobilisation de l'uréase sur la matrice inorganique a lieu à la surface des cristallites. La taille trop volumineuse de l'enzyme empêche son intercalation. Cependant, la remise en suspension dans l'eau a montré une forte rétention de l'enzyme sur la matrice HDL. L'immobilisation par adsorption a mis en évidence des capacités d'adsorption élevées et une forte affinité entre la protéine et les feuillets HDL reposant sur des interactions électrostatiques et de type hydrogène. Dans les deux autres méthodes, la décohérence des feuillets HDL permet d'augmenter la quantité de biomolécules confinées. La coprécipitation a montré la possibilité de conserver la quantité d'uréase initiale mais son augmentation entraîne un désordre de l'empilement des plaquettes HDL et le matériau se disperse dans un réseau organique. Cette étude a montré que l'activité de l'uréase dépend de paramètres tel que la méthode d'immobilisation, le pH de précipitation, le rapport uréase/HDL, le mode de séchage.

La réalisation des biocapteurs nécessite également la mise en forme des matériaux biologiquement actifs en couche, c'est pourquoi nous avons réalisé des multicouches nanostructurées HDL-Uréase par la technique Langmuir-Blodgett. Après avoir optimisé les conditions d'obtention des films HDL et HDL-Uréase, nous avons pu réaliser des biocapteurs fonctionnels. Pour améliorer leurs performances, c'est-à-dire préserver l'enzyme, plusieurs paramètres tel que la perméabilité de la biomembrane ont été étudiés.

Cette première étude sur le confinement de protéines sur des HDL, depuis l'élaboration de la matrice hôte jusqu'à la réalisation du biocapteur fonctionnel, a montré la possibilité d'élaborer des biocapteurs électrochimiques. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives sur l'immobilisation d'autres enzymes, sur l'optimisation de films hybrides Langmuir-Blodgett ayant des propriétés biologiques.

**Mots clés : Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL), argiles anioniques, Matériaux hybrides, Enzymes (Uréase), Activité enzymatique, Films Langmuir-Blodgett, Biocapteurs**